



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di laurea specialistica in Neurobiologia molecolare

Tesi di laurea specialistica

***La via di AKT come possibile bersaglio per
trattamenti volti a migliorare i sintomi della
sindrome di Rett in modelli murini***

Relatore

Prof. Tommaso Pizzorusso

Correlatori

Prof. Federico Cremisi

Prof.ssa Michela Ori

Candidata

Giulia Lunardi

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

Indice

RIASSUNTO	4
ABSTRACT	6
INTRODUZIONE	8
1. Rett classica	10
1.1 La proteina MECP2	11
2. Variante di Hanefeld	16
2.1 La proteina CDKL5	17
3. Variante congenita	20
4. Modelli murini di sindrome di Rett	21
4.1 Modello MECP2	21
4.2 Modello CDKL5	22
5. Pathway di PI3K/AKT/mTOR	23
6. Spine dendritiche	26
7. Neurotrofine come possibile terapia per la sindrome di Rett	29
SCOPO DELLA TESI	31
MATERIALI E METODI	32
8. Studio del gene MECP2	32
8.1 Animali	32
8.2 Western blotting	32
9. Studio del gene CDKL5	33
9.1 Animali	33
9.2 Immunoistochimica	34
9.3 Western blotting	35

9.4 Imaging delle spine	35
9.5 Chirurgia nel topo durante lo sviluppo (P27)	37
9.6 Imaging <i>in vivo</i>	38
9.7 Trattamento con IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1)	39
9.8 Isolamento dei sinaptosomi per la quantificazione di PSD-95	40
9.9 Western blotting	40
10. Processamento delle immagini e analisi dati	41
11. Analisi statistica	41
RISULTATI	42
12. Il modello MECP2	43
12.1 Fosforilazione di S6 nel modello MECP2	43
12.2 Il pathway di ERK nel modello MECP2	46
12.3 Fosforilazione di AKT nel modello MECP2	47
13. Deficit nel signaling cellulare in topi CDKL5 KO	49
13.1 Deficit nella via di AKT nel modello CDKL5	49
13.2 Fosforilazione di S6 nel modello CDKL5	50
14. Spine dendritiche nel modello CDKL5	52
14.1 Densità delle spine dendritiche in topi CDKL5 KO	
in seguito al trattamento con IGF-1	53
15. Deficit sinaptico e recupero con IGF-1	54
DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	56
RINGRAZIAMENTI	60
BIBLIOGRAFIA	61

Riassunto

La sindrome di Rett (RTT) é un disordine progressivo del neurosviluppo legato al cromosoma X, e rappresenta la seconda causa di ritardo mentale nel sesso femminile. Nella forma di RTT classica la patologia é associata a mutazioni del gene MECP2 (methyl-CpG-binding protein 2) sul cromosoma X. I pazienti presentano i primi segni della malattia dopo un periodo di normale sviluppo che può durare dai 6 ai 18 mesi di età. Successivamente non raggiungono le normali tappe dello sviluppo psicomotorio ed eventualmente regrediscono, perdendo l'uso finalistico delle mani, le abilità linguistiche, e sviluppando comportamenti di tipo autistico.

In aggiunta alla variante classica della malattia, ci sono altre varianti atipiche in cui si rilevano mutazioni in altri loci, come la mutazione di CDKL5 nella variante a epilessia precoce. In questa forma della malattia il periodo perinatale é seguito dalla comparsa di convulsioni generalizzate e spasmi mioclonici, seguiti da gravi deficit dello sviluppo cognitivo e discinesie.

Per studiare le alterazioni neuronali della Sindrome di Rett, abbiamo utilizzato due linee di topi knockout (KO): una per il gene MECP2, e un'altra più recente che reca la delezione del gene CDKL5 sul cromosoma X.

Grazie ai modelli murini sappiamo che livelli alterati di MECP2 nei neuroni causano difetti nell'arborizzazione dendritica e nella plasticità sinaptica.

Nella prima parte del mio lavoro di tesi abbiamo indagato la regolazione della sintesi proteica nei topi MECP2 KO, perché ci sono evidenze che la sintesi proteica aberrante sia una causa delle caratteristiche cliniche alla base dei disturbi dello spettro autistico. E' stato visto inoltre che alterazioni nelle cascate di segnale coinvolte nella regolazione della sintesi proteica come la via di *mTOR* (mammalian Target Of Rapamycin) e *PI3K* (PhosphoInositide 3-Kinase), sono associate a malattie del neurosviluppo correlate a grave ritardo mentale come l'X-fragile. Inoltre la sintesi proteica nei dendriti indotta dall'attività sinaptica, richiede l'azione della via di ERK.

Per studiare i possibili difetti di queste vie intracellulari nei topi MECP2 KO, abbiamo analizzato mediante western blotting la fosforilazione di rpS6 (ribosomal protein S6), una componente della subunità ribosomale 40S, che correla con l'attivazione della sintesi proteica.

Dalle nostre analisi abbiamo riscontrato una diminuzione della fosforilazione di rpS6 nei topi KO, e, dato che rpS6 è un target sia di ERK che della via di mTOR, è stato interessante andare a ricercare quale delle due vie fosse deficitaria.

I risultati emersi dimostrano che la via di ERK non è affetta, mentre c'è una ridotta funzionalità della via di AKT/mTOR, che causa il deficit di sintesi proteica nei topi MECP2 KO. Questo pathway è alterato anche nel modello murino di Rett atipica (CDKL5).

Un buon candidato per migliorare i sintomi della sindrome di RTT è Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), un fattore di crescita prodotto endogenamente che promuove la maturazione cerebrale. Questa molecola è in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica ed è già stata testata nel modello "MECP2" della malattia, dimostrando di poter aumentare la durata della vita, e di migliorare la locomozione e i deficit sinaptici. Nella seconda parte del mio lavoro di tesi, abbiamo trattato gli animali CDKL5^{-y} per 4 giorni consecutivi con IGF-1, prelevato la corteccia somatosensoriale ed isolato i sinaptosomi per concentrare le proteine sinaptiche. In seguito abbiamo analizzato i nostri campioni con il Western blotting riscontrando un aumento della proteina PSD-95 (Post-Synaptic Density-95) negli animali trattati con IGF-1 rispetto ai controlli trattati con soluzione fisiologica. Dato che PSD-95 è un marker di maturazione sinaptica, abbiamo misurato la densità delle spine dendritiche in topi CDKL5^{-y}.

I nostri esperimenti mostrano un incremento delle protrusioni lungo l'asse dendritico, indicando IGF-1 come possibile agente terapeutico.

Questo fornisce un nuovo contesto in cui possono essere sviluppati ulteriori interventi terapeutici volti a migliorare le condizioni dei pazienti affetti dalla sindrome di Rett.

Abstract

Rett syndrome (RTT) is the second most common cause of severe intellectual disability in females. In the classic form, the disease is associated with mutations in MECP2, a gene on Xq28 that encodes the transcriptional regulator Methyl CpG-binding protein. The patients of this form of disease present an apparent normal early development followed by subsequent psychomotor regression in early childhood, affecting predominantly language and purposeful hand skills. Gait impairment and stereotypic hand movements are the other two main diagnostic criteria. Other common features, some of which are considered supportive diagnostic criteria, include growth retardation, breathing disturbances, seizures, and autistic behavior.

Several other variants of Rett syndrome have been described. In 1985, for example, Hanefeld described a variant with the early appearance of convulsions. In this variant, the normal perinatal period is soon followed by the appearance of seizures, usually infantile spasms. This atypical form of Rett is associated with mutations in the X-linked gene CDKL5 (Cyclin Dependent Kinase-Like 5).

In order to study neurological alterations of Rett syndrome, we performed analysis on two different animal models: one with a mutation in MECP2 gene and another, more recent, that carries a mutation in CDKL5.

In the first part of my work, we have studied the regulation of protein synthesis in the MECP2 model, because there's mounting evidence that misregulation of pathways involved in protein synthesis correlates with severe mental retardation (e.g. X-frangible) and autism (Kelleher and Bear, 2008). We have performed Western blotting studies to analyze the phosphorylation of rpS6 (ribosomal protein S6), a component of the ribosomal subunit 40S, which correlates with activation of protein synthesis.

We have observed a decrease of rpS6 phosphorylation in MECP2 KO mice, and because rpS6 is a target of both AKT/mTOR and ERK pathways, we studied which one was altered.

Our results show a reduced functionality of AKT/mTOR, but not of ERK pathway, that causes the deficit in protein synthesis.

This pathway is altered even in the CDKL5 model.

A good candidate to improve symptoms is Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), a growth factor capable to cross blood-brain barrier that promotes cerebral maturation and ameliorates synaptic deficits.

In the second part of my work, we treated CDKL5 KO mice for 4 consecutive days with IGF-1, and we next analyzed the expression of PSD-95 (Post-Synaptic Density-95) in treated animals compared to controls. Given that PSD-95 is a marker of synaptic maturation, we measured the density of dendritic spines in CDKL5 KO mice. Our experiments show an increase in dendritic protrusions along dendritic axis, indicating IGF-1 as a possible therapeutic agent.

This provides a new context in which therapeutic interventions can be developed to improve the condition of patients suffering from Rett syndrome.

Introduzione

La sindrome di Rett (RTT) é la prima causa di grave disabilità cognitiva nel sesso femminile con approssimativamente 1:10'000 femmine affette nel mondo.

La RTT, nella sua forma classica, é stata caratterizzata nella metà degli anni '60 da un pediatra austriaco, il Dr. Andreas Rett, che riscontrò lo stesso movimento ripetitivo delle mani e lo stesso fenotipo del neurosviluppo in un gruppo di bambine che aveva in cura (Rett 1966). Questa osservazione non venne resa pubblica alla maggior parte della comunità scientifica per via delle sue pubblicazioni in tedesco sulle riviste mediche. Non prima del 1980 il neurologo svedese Dr. Bengt Hagberg e colleghi riportarono un caso di 35 bambine che avevano una simile progressione della malattia: comparsa dei sintomi fra i 7 e i 18 mesi di età con blocco dello sviluppo, seguito da un rapido peggioramento delle funzioni neurologiche (Hagberg et al., 1983).

La sindrome di Rett è però caratterizzata da ampia eterogeneità clinica e, oltre alla forma classica, sono state descritte almeno 5 varianti. Queste includono:

1. La **forma "frusta"** presenta un'insorgenza tardiva dei sintomi rispetto alla forma classica. La regressione inizia tra il primo e il terzo anno di vita. L'uso delle mani é preservato e i movimenti stereotipati caratteristici sono meno intensi.
2. La **variante Zappella** o "*Preseved speech variant*" (PSV) è caratterizzata dalla capacità di formulare le frasi, anche se i pazienti non riescono ad inserirle in un contesto ben preciso. Inoltre mostrano la capacità di utilizzare le mani in modo finalizzato e la circonferenza cranica é nella norma. Sono generalmente sovrappeso rispetto ai pazienti affetti della forma classica e presentano una marcata cifosi (Zappella et al., 2001).

3. La **forma congenita** non presenta un normale periodo di sviluppo, ma i sintomi compaiono già dal primo giorno di vita e la regressione si verifica entro il primo mese di vita.
4. La **variante di Hanefeld**, chiamata anche *Encefalopatia epilettica precoce di tipo 2*, è caratterizzata da un'insorgenza precoce rispetto alla forma classica. I sintomi si presentano entro il sesto mese di vita accompagnati da crisi epilettiche più o meno gravi (Hanefeld, 1985).
5. La **variante a regressione tardiva**, di rarissima osservazione.

Le differenze osservate tra i pazienti Rett sono dovute sia al coinvolgimento di geni differenti, che a fenomeni di mosaicismo genetico dovuto all'inattivazione del cromosoma X.

Data la complessità del quadro clinico che caratterizza la RTT, e la grande variabilità dei sintomi che si presentano tra i vari pazienti, sono stati stabiliti dei criteri diagnostici che consentono di identificare quale variante è presente in un determinato soggetto (Neul et al., 2010).

Per quanto riguarda la variante di Hanefeld, uno studio recente ha dimostrato che la maggior parte dei pazienti a cui era stata diagnosticata questa malattia non rientra nei criteri stabiliti (Fehr et al., 2013).

1. Rett classica

Nella forma classica della sindrome di RTT, nel 95% dei casi é presente una mutazione nel gene che codifica per un regolatore della trascrizione: methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2). La RTT é diagnosticata precocemente nella vita di una bambina, basandosi su precisi criteri diagnostici che sono stati estesamente stabiliti. Questi criteri si basano sulla peculiare progressione della malattia, che si manifesta con un arresto dello sviluppo dopo i primi 6–18 mesi di vita apparentemente normali (Percy et al., 2010). A questo blocco seguono la progressiva perdita di abilità motorie e linguistiche e disfunzioni nei comportamenti sociali. Il periodo successivo consiste nella stabilizzazione e nel recupero della socialità dall'età di 4-5 anni con il suo mantenimento anche nell'età adulta.

La RTT ha dei tratti distintivi che la caratterizzano dagli altri disturbi del neurosviluppo (incluso l'autismo). I più notevoli sono: la perdita di abilità motorie sia fini che grossolane, l'incapacità di interagire socialmente in età precoce e i movimenti stereotipati delle mani. Altre caratteristiche che possono essere presenti: disturbi d'ansia, anomalie respiratorie, bruxismo, disfunzioni gastro-intestinali, osteopenia e attacchi epilettici.

La RTT é considerata un disturbo dello spettro autistico proprio per l'assenza di contatto sociale nelle bambine fino ai 4 anni (Percy, 2011). In ogni caso la maggior parte delle osservazioni anatomiche prende le distanze dall'autismo: gli individui autistici sono tipicamente maschi e caratterizzati da un'aumentata circonferenza cranica, la RTT colpisce quasi esclusivamente le femmine, che attraversano un periodo di rallentamento della crescita della testa, che inizia a un mese e mezzo di età (Tarquinio et al., 2012). I bambini autistici a livello cognitivo mostrano un funzionamento intellettuale migliore, lo sviluppo di un linguaggio rudimentale e un incremento di comportamenti imitativi, mentre nella sindrome di Rett si osservano solo gesti stereotipati delle mani meno complessi e meno vari (Hobson, 1993).

Nei pazienti affetti da RTT si osserva sia una riduzione dell'arborizzazione dendritica che della densità delle spine dendritiche in molte aree cerebrali, incluse

corteccia e ippocampo, suggerendo che possano esservi connessioni anomale tra i neuroni (Armstrong et al., 1995; Belichenko et al., 1994; Chapleau et al., 2009). Gli individui affetti da RTT sopravvivono tipicamente fino alla mezza età, e attualmente si stima che possano sopravvivere ancora di più.

1.1 La proteina MECP2

MECP2 è una proteina nucleare basica in grado di legare le sequenze di DNA metilate alla citosina 50CpG. Il gene MECP2 è altamente conservato tra i mammiferi e comprende vari domini: il più grande di questi è il Methyl DNA Binding Domain (MBD), composto da 100 amminoacidi (Nan et al., 1993). Altri domini includono il segnale di localizzazione nucleare e un dominio di repressione trascrizionale (TRD) (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

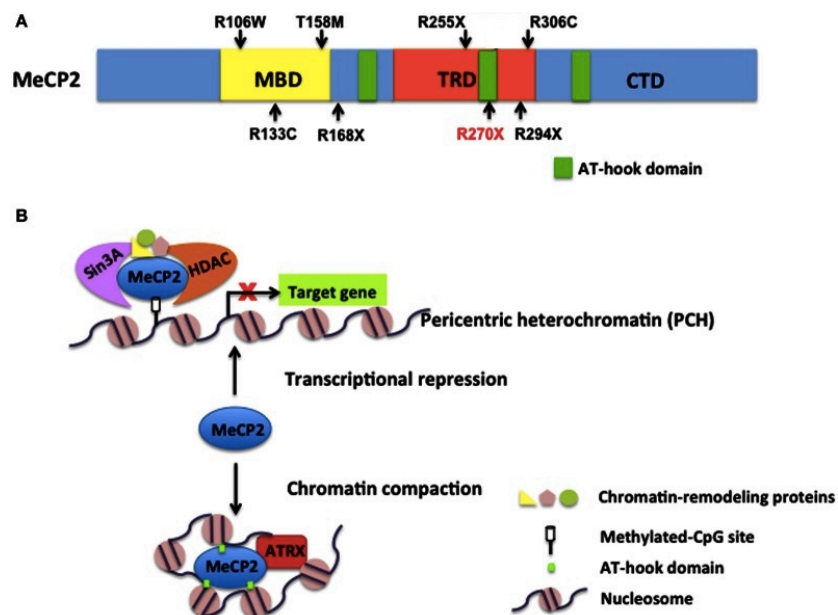


Figura 1. (Xu and Pozzo-Miller, 2013)

(A)Struttura e funzione di MECP2 nella regolazione genica e nel rimodellamento della cromatina. Figura schematica della struttura di MECP2 con i suoi domini funzionali e i 3 domini AT-hook che legano il solco minore del DNA. Con le frecce nere sono indicate le mutazioni più comuni che si riscontrano nella sindrome di RTT. Notare che la R270X é una delle mutazioni più comuni.

(B)Funzione di MECP2 nella repressione della trascrizione e nella compattazione della cromatina. Come repressore trascrizionale, MECP2 recluta Sin3A, l'istone deacetilasi (HDACs), e alcune proteine che rimodellano la cromatina per silenziare la trascrizione di geni target. I domini AT-hook consentono a MECP2 di alterare la conformazione della cromatina reclutando ATRX e PCH.

Quasi tutte le mutazioni in MECP2 sono *de novo*. Ci sono comunque delle eccezioni di casi familiari in cui la mutazione é stata ereditata da madri "poco affette" o sane, ma con un mosaicismo nelle gonadi che le rende portatrici di un'inattivazione favorevole del cromosoma X. Anche se la maggior parte delle mutazioni sono disperse nel gene, si conoscono alcune mutazioni missenso che avvengono nel MBD. Un'analisi recente ha rivelato l'esistenza di un altro gruppo di mutazioni missenso localizzate all'estremità C-terminale del TRD, che includono gli amminoacidi 302–306. Per rafforzarne la rilevanza patologica, in questi loci non esistono mutazioni neutre presenti nella popolazione. Recentemente é stato scoperto il ruolo funzionale degli amminoacidi 302–306: sono richiesti per il legame al complesso di repressione trascrizionale Ncor/SMRT (Lyst et al., 2013). Le mutazioni che appaiono distali rispetto al MBD (nonsense, frameshift, mutazioni di splicing), risultano in una prematura terminazione della proteina (Matijevic et al., 2009; Philippe et al., 2006; Vacca et al., 2001). Duplicazioni dell'intero gene causano un fenotipo diverso dalla sindrome di RTT, caratterizzato principalmente da grave ritardo mentale, infezioni ricorrenti ed epilessia. Questa combinazione di sintomi é conosciuta come "sindrome da duplicazione di MECP2" (Shimada et al., 2013).

MECP2 é espresso in molti tessuti, ma sembra essere più abbondante nel cervello (Shahbazian and Zoghbi, 2002). Durante l'embriogenesi, i livelli neuronali di

MECP2 sono relativamente bassi, ma aumentano progressivamente durante il periodo post-natale di maturazione (Kishi and Macklis, 2004; Skene et al., 2010).

Nel topo, MECP2 non é molto espresso nella neocortex durante la vita embrionale, eccetto nelle cellule di Cajal–Retzius, una delle popolazioni di neuroni nella corteccia in sviluppo. L'espressione di MECP2 si sviluppa progressivamente dagli strati corticali profondi a quelli superficiali. Quindi c'è un chiaro parallelo tra la maturazione neuronale e l'espressione di MECP2 (Kishi and Macklis, 2004; Shahbazian and Zoghbi, 2002). L'aumento durante lo sviluppo di MECP2 é stato confermato in molte regioni cerebrali, come nel cervelletto e nell'epitelio olfattivo (Cohen et al., 2003; Mullaney et al., 2004) e suggerisce che MECP2 abbia un ruolo fondamentale nello sviluppo del SNC.

Riguardo al meccanismo molecolare con cui agisce MECP2, bisogna rispondere ancora a molte domande (Guy et al., 2011): MECP2 era inizialmente considerato un repressore trascrizionale, la cui forza dipendeva dalla posizione e densità delle isole CpG-metilate vicino a un promotore (Nan et al., 1997). Il silenziamento genico mediato da MECP2 può avvenire attraverso la modifica della cromatina mediata dall'interazione tra MECP2 e i complessi di repressione Sin3A/HDACI o Ski/NcoR/HDACII (Jones et al., 1998; Kokura et al., 2001; Nan et al., 1998). Questi enzimi rimodellano la cromatina, che in seguito diventa inaccessibile al macchinario della trascrizione (Nan et al., 1998).

Altri studi mostrano che MECP2, in aggiunta al suo ruolo di repressore globale, agisce come regolatore di splicing (Young et al., 2005). Gli autori identificano come partner di MECP2 la RNA-binding protein "Y box-binding protein 1" (YB1), una componente principale delle particelle ribonucleoproteiche che controllano il processamento dell'mRNA. Più specificamente, nei neuroni privi di MECP2, lo splicing é alterato, e possono essere presenti forme aberranti di splicing (Young et al., 2005).

Un'altra sorprendente scoperta, ottenuta grazie a un'ampia analisi dell'espressione genica in mutanti MECP2, mostra che contrariamente alle aspettative, MECP2 può

attivare l'espressione di molti geni sia direttamente che indirettamente (Chahrour et al., 2008). In supporto a questa tesi, è stata riportata un'interazione biochimica tra MECP2 e l'attivatore trascrizionale CREB (Chahrour et al., 2008).

Molti geni sono dei candidati promettenti per essere regolati da MECP2. Questi includono i geni che hanno un'espressione differenziale dipendente dalla metilazione come i geni imprinted (Paoloni-Giacobino and Chaillet, 2006).

In particolare Ube 3a è stato particolarmente studiato perché è un gene imprinted nel cervello, ed esiste una malattia a metà tra la sindrome di RTT e la sindrome di Angelman causata dalla mancanza di Ube3a (Imessaoudene et al., 2001; Milani et al., 2005). BDNF è un gene che modifica la propria espressione in modo consistente quando MECP2 è assente.

BDNF è una molecola chiave per lo sviluppo del cervello e per la plasticità (Cohen-Cory et al., 2010; Martinowich et al., 2003), e la sua espressione è anomala in molte condizioni psichiatriche (Tsankova et al., 2007). MECP2 si lega al promotore IV del gene di BDNF (Chen et al., 2003b; Martinowich et al., 2003) ed il legame di MECP2 diminuisce in seguito alla depolarizzazione del neurone in coltura primaria. La perdita del legame, dovuta alla fosforilazione di MECP2 sulla S421, permette ai geni di essere trascritti (Chen et al., 2003b). L'ipotesi che normalmente MECP2 reprima la trascrizione di BDNF farebbe pensare che la perdita di funzione di MECP2 nella RTT, o in modelli murini della malattia, fosse associata ad un aumento di trascrizione di BDNF. Al contrario, in studi *in vivo*, i topi MECP2 KO o eterozigoti mostrano livelli ridotti dell'mRNA di BDNF e della relativa proteina (Chang et al., 2006a; Ogier et al., 2007; Wang et al., 2006). Dal momento che l'attività neuronale è affetta nei topi MECP2 KO, diventano difficili le correlazioni tra la perdita di MECP2 e l'aumento dell'espressione genica (Dani et al., 2005).

E' chiaro che sono necessarie ulteriori analisi per stabilire se MECP2 sia semplicemente una methyl-DNA binding protein coinvolta principalmente nella repressione trascrizionale o un regolatore della trascrizione con azione globale o locale. Ad esempio, lavori recenti dimostrano che MECP2 si lega diffusamente nel

genoma, suggerendo che MECP2 funzioni più come un regolatore globale della trascrizione e del remodeling della cromatina piuttosto che un fattore di trascrizione sequenza-specifico (Cohen et al., 2011; Skene et al., 2010) (Cohen et al., 2011; Skene et al., 2010).

Lo stato attuale della nostra conoscenza suggerisce che i disordini correlati a MECP2 siano il risultato di una regolazione errata dei processi di trascrizione e splicing. Comunque, la mancanza di MECP2 non sembra causare una forte deregolazione dell'espressione genica, ma piccoli effetti su molti geni, in modo dipendente dal contesto cellulare, dallo stadio dello sviluppo, e in modo stimolo-dipendente.

2. Variante di Hanefeld

La variante di Hanefeld , nota anche con il nome di *Encefalopatia epilettica precoce di tipo 2*, é causata da una mutazione nel gene CDKL5 (Cyclin-Dependent Kinase-Like 5), conosciuta anche come STK9. Il suo prodotto proteico é una serina/treonina chinasi, il cui gene é localizzato nella regione Xp22.

Anche se la malattia causata da mutazioni in CDKL5 condivide caratteristiche comuni con la sindrome di Rett, ci sono lavori recenti effettuati su 86 soggetti che sostengono che dovrebbe essere considerata una patologia clinicamente distinta, soprattutto per il suo esordio precoce e per la mancanza di regressione dopo un periodo di normale sviluppo (Fehr et al., 2013).

La principale caratteristica della malattia legata a CDKL5 sono le crisi epilettiche che iniziano nei primi mesi di vita, i movimenti stereotipati delle mani, rigidità motoria, e mancanza di acquisizione del linguaggio (Bahi-Buisson et al., 2008; Fehr et al., 2013). In alcuni portatori sono state notate altre caratteristiche aggiuntive, inclusi problemi gastrointestinali, bruxismo (Bahi-Buisson et al., 2008; Evans et al., 2005), e un caratteristico sguardo laterale (Bahi-Buisson et al., 2008).

Nelle bambine i sintomi spaziano dalle forme più lievi a forme severe con crisi intrattabili, mentre il fenotipo maschile cade sempre nello spettro più grave (Guerrini and Parrini, 2012).

La malattia é più frequentemente riscontrata nelle femmine (8:1) (Fehr et al., 2013).

2.1 La proteina CDKL5

Il gene CDKL5 é composto da 20 esoni e codifica per una proteina di 1030 amminoacidi (Mari et al., 2005) che é espressa soprattutto nel cervello di ratto e in quello umano (Chen et al., 2010; Montini et al., 1998). CDKL5 appartiene alla famiglia CDKL che comprende 5 membri: da CDKL1 a CDKL5 (Malumbres et al., 2009).

Nel topo CDKL5 é una proteina ubiquitaria epressa ad alti livelli nel cervello (corteccia cerebrale, ippocampo, cervelletto, striato e tronco encefalico), timo, e testicoli (Lin et al., 2005), sia negli stadi precoci post-natali che nel cervello dell'adulto; questo profilo di espressione suggerisce che questa proteina sia importante per la maturazione neuronale (Rusconi et al., 2008).

Per quanto riguarda la localizzazione, CDKL5 si trova sia nel citoplasma che nel nucleo, dove colocalizza con i "nuclear speckles" partecipando al loro disassemblamento e redistribuzione (Ricciardi et al., 2009; Rusconi et al., 2008).

Il gene murino CDKL5 é espresso in 2 isoforme, con espressione separata in neuroni e astrociti (Chen et al., 2010).

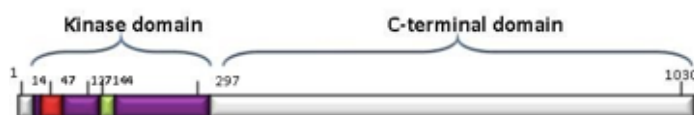


Figura 2. Rappresentazione schematica del gene CDKL5. Sono indicati i domini di cui si conosce la funzione: aa 14–47 ATP-binding site (rosso); in verde, sito di attività Ser/thr chinasi (aa 127–144).

Le mutazioni nel gene CDKL5 sono localizzate soprattutto all'interno del dominio catalitico, suggerendo fortemente che proprio la mancata attività catalitica giochi un ruolo importante nella patogenesi di questa encefalopatia. I pazienti che hanno una

mutazione nel sito di legame per l'ATP come la p.Ala40Val tipicamente camminano senza aiuto, hanno normocefalia, una miglior abilità nell'uso delle mani e più frequentemente forme di epilessia curabili rispetto a bambine con altre mutazioni in CDKL5. In contrasto, pazienti con mutazioni nel dominio chinasi (come p.Arg59X, p.Arg134X, p.Arg178Trp/Pro/Gln, o c.145 + 2T > C) e mutazioni frameshift nella regione del C-terminale, hanno un fenotipo più severo con spasmi infantili, encefalopatia epilettica refrattaria ai trattamenti, microcefalia e incapacità di camminare (Bahi-Buisson et al., 2012; Tao et al., 2004).

Dati recenti mostrano che mutazioni in CDKL5 possono essere correlate ad alterazioni sinaptiche. Studi sia nel topo che in linee cellulari umane (iPSC-derived neurons), derivate da pazienti che recano la mutazione in CDKL5, dimostrano che questa proteina è localizzata alle sinapsi eccitatorie e contribuisce alla corretta struttura delle spine dendritiche e all'attività delle sinapsi (Ricciardi et al., 2012). Gli autori hanno trovato che CDKL5 fosforila NGL-1, una proteina importante per l'omeostasi sinaptica (Kim and Sheng, 2009; Kim et al., 2006; Woo et al., 2009). In seguito, la fosforilazione di NGL-1 promuove il legame con PSD-95 (Post-Synaptic Density-95), una proteina chiave per l'organizzazione della densità sinaptica. Il legame a PSD-95 consente la localizzazione di CDKL5 alle sinapsi eccitatorie. È interessante notare che questo legame non è costitutivo, ma regolato dalla palmitoilazione di PSD-95.

Inoltre, mutazioni patogene che troncano il C-terminale di CDKL5, diminuiscono il suo legame a PSD-95 e l'accumulazione sinaptica. La down-regulation di CDKL5 attraverso RNA interference (RNAi), dimostra che la diminuita interazione "CDKL5-PSD-95" inibisce la formazione di spine dendritiche e la loro crescita (Zhu et al., 2013).

Questi dati indicano che CDKL5 è molto importante per lo sviluppo delle spine dendritiche e nella morfogenesi delle sinapsi e conferma che le alterazioni sinaptiche sono la maggior complicazione nella RTT.

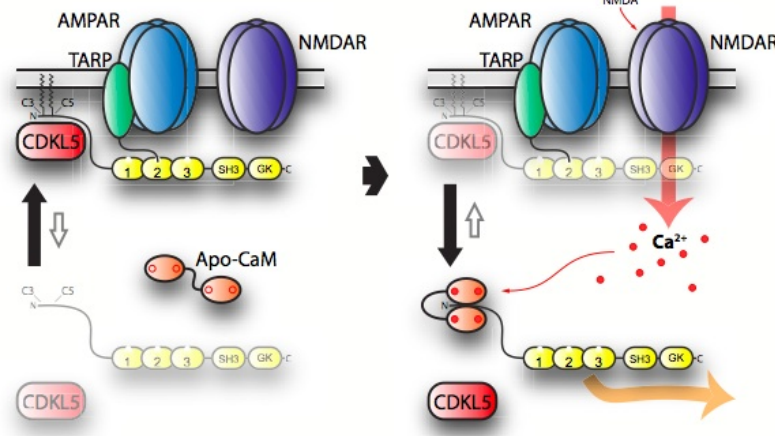


Figura 3. Zhang et al., 2014) **Modello del rilascio postsinaptico di PSD-95 indotto da Ca^{2+} /CaM.**

(Sinistra) In condizioni basali, PSD-95 (gialla) è legata nel sito postsinaptico attraverso la palmitoilazione di C3 e C5. Da un lato lega i recettori AMPA del glutammato (blu) attraverso il legame con il suo primo e secondo dominio PDZ al C-terminale della loro subunità ausiliaria TARP (verde) nei siti postsinaptici. Dall'altro lato ancora anche CDKL5 (rosso) attraverso il suo N-terminale palmitoilato. PSD-95 cicla frequentemente tra la palmitoilazione e la depalmitoilazione.

(Destra) L' influsso di Ca^{2+} attraverso il recettore NMDA del glutammato induce il legame di Ca^{2+} /CaM a PSD-95 depalmitoilata per prevenire la ri-palmitoilazione. In conseguenza, una frazione di PSD-95 lascia il sito post-sinaptico e CDKL5 ancorata è ridotta.

3. Variante congenita

FOXG1 é il gene implicato nella variante congenita della sindrome di RTT (Ariani et al., 2008), e codifica per un repressore trascrizionale "winged-helix" importante per lo sviluppo precoce del patterning dorso-ventrale del telencefalo ventrale (Danesin et al., 2009; Hanashima et al., 2004). In aggiunta, FOXG1 controlla la produzione di specifici sottotipi neuronali e regola il bilancio tra la proliferazione dei progenitori neuronali e la differenziazione nel telencefalo (Hanashima et al., 2004; Miyoshi and Fishell, 2012; Shen et al., 2006). FOXG1 é espresso dagli stadi più precoci dello sviluppo telencefalico fino alla vita adulta. Nei neuroni post-mitotici differenziati, FOXG1 promuove la sopravvivenza cellulare attraverso la via di PI3K/AKT ed ha un effetto di protezione dagli effetti neurotossici di MECP2 (Dastidar et al., 2011, 2012). Dastidar et al. hanno studiato il ruolo di due isoforme di splicing di MECP2 identificate precedentemente in colture di neuroni di cervelletto di topo (CCNs): MECP2-e1 e MECP2-e2. Gli autori hanno dimostrato che queste due isoforme esibiscono differenti profili di espressione e giocano ruoli funzionali divergenti nelle CCNs. Quando le cellule erano soggette a condizioni che inducevano l'apoptosi, l'espressione dell'mRNA dell'isoforma e2 era sovraregolata mentre l'espressione di e1 ridotta. La sovraespressione di MECP2-e2 promuove l'apoptosi nelle cellule sane, mentre il suo knockdown rende le cellule resistenti a trattamenti che inducono l'apoptosi.

Al contrario, nessuna sovraespressione né assenza di MECP2-e1 influisce sulla vitalità cellulare. Questo studio inoltre mostra che FOXG1 interagisce preferenzialmente con MECP2-e2 e che questa interazione ne restringe gli effetti neurotossici. Gli autori concludono che MECP2-e2 promuove la morte neuronale quando non é controllato da FOXG1.

4. Modelli murini di sindrome di Rett

4.1 Modello MECP2

Il modello da noi utilizzato é quello generato dal gruppo di Jaenisch (Chen et al., 2001).

I topi mutanti sembrano in salute per le prime settimane di vita, ma sviluppano comportamenti anomali come nervosismo, tremore corporeo, erezione pilifera, e occasionalmente respirazione difficoltosa a 5 settimane di vita. A stadi più tardivi della malattia i mutanti diventano ipoattivi, tremano quando vengono manipolati, e spesso iniziano a perdere peso.

La maggior parte dei mutanti muore a circa 10 settimane senza una stretta correlazione tra il deterioramento fisico e il momento della morte.

Le femmine mutanti eterozigoti sembrano normali per i primi 4 mesi, ma iniziano a mostrare sintomi come ridotta attività e andatura incerta ad uno stadio più tardivo.

Nell'uomo, la forma di RTT classica é riservata alle femmine, mentre la maggior parte dei maschi che portano una mutazione in MECP2 sono destinati a morire durante il periodo prenatale o perinatale (Schanen et al., 1998; Van den Veyver and Zoghbi, 2000; Villard et al., 2000).

Per queste osservazioni possiamo dire che nel topo la mancanza di MECP2 causa un fenotipo meno severo rispetto all'uomo, dal momento che mutanti emizigoti sviluppano sintomi e muoiono solo da giovani adulti e le femmine eterozigoti rimangono in salute fino all'età adulta.

La caratteristica più simile tra il topo mutante e la condizione umana é la riduzione in volume sia del cervello che della cellula neuronale.

Per questo, le similitudini tra il cervello di topi mutanti e dei pazienti RTT indicano che la mancanza di MECP2 porta a cambiamenti comparabili sia nel cervello che nei neuroni di entrambe le specie.

4.2 Modello CDKL5

Il modello che abbiamo utilizzato per lo studio della forma di RTT atipica è quello creato dal gruppo di Gross (Amendola et al., 2014).

Si tratta di un modello murino che presenta una delezione nel gene che codifica per la proteina CDKL5. Gli studi effettuati finora a livello comportamentale hanno riscontrato in tali animali la comparsa di una ridotta attività motoria, difficoltà nel seguire con lo sguardo gli oggetti in movimento, incrocio degli arti inferiori, ipoattività, scorretto allineamento della testa e anormale risposta EGG in seguito a trattamento con farmaci convulsivanti.

I sintomi presenti nel modello animale mimano in parte il fenotipo umano, rappresentando comunque un buon modello da studiare.

5. Pathway di PI3K/AKT/mTOR

La proteina AKT (conosciuta anche come PKB) è presente in 3 isoforme diverse (AKT 1-3), che rappresentano la maggior parte dei segnali provenienti da PI3K.

Da quando è stata scoperta la Ser/thr chinasi AKT come proto-oncogene, si è focalizzata l'attenzione sul suo ruolo in diversi processi cellulari come la progressione del cancro e il metabolismo del glucosio, per il quale è di fondamentale importanza AKT2 (Homayounfar et al., 2014). Le patologie associate a difetti nel signaling dell'insulina e condizioni come il cancro, sono state spesso associate a mutazioni di AKT nella linea germinale.

AKT regola la crescita cellulare agendo sul complesso TSC1/TSC2 e sulla via di mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Owonikoko and Khuri, 2013), così come sul ciclo cellulare e sulla proliferazione cellulare attraverso la sua azione diretta sugli inibitori di CDK p21 e p27, e il suo effetto indiretto sui livelli della ciclina D1 e p53. AKT è il maggior mediatore di sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione indiretta di segnali pro-apoptotici come BAD e la famiglia di fattori di trascrizione FoxO e myc (Misra and Pizzo, 2010).

Inoltre, è stato dimostrato che AKT regola proteine coinvolte in funzioni neuronali come il recettore per il GABA, ataxin-1 (Chen et al., 2003a), e huntingtin (Humbert et al., 2002). Infine la fosforilazione di lamin A da parte di AKT gioca un ruolo importante nell'organizzazione delle proteine nucleari. Queste scoperte rendono AKT/PKB un importante target terapeutico per il trattamento di cancro, diabete, laminopatie e malattie neurodegenerative.

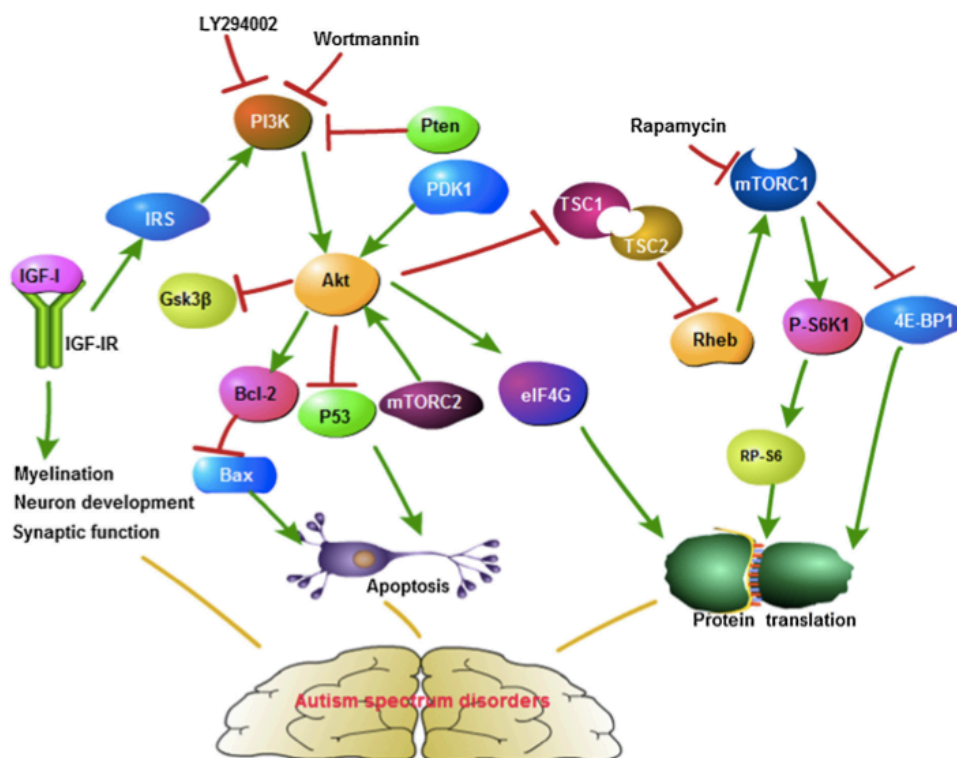


Figura 4. (Chen et al., 2014) **La via di AKT/mTOR**

La cascata di AKT é attivata da recettori tirosina chinasi, integrine, recettori delle cellule B e T, dalle citochine, recettori accoppiati a proteine G e altri stimoli che inducono la produzione di fosfatidilinositolo 3,4,5 trifosfato (PtdIns(3,4,5)P3) da parte della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K). Questi lipidi servono come siti di ancoraggio alla membrana plasmatica per proteine con domini di omologia alla pleckstrina (PH), inclusi AKT e il suo attivatore a monte PDK1. Il "tumor suppressor" PTEN é considerato il maggior inibitore di AKT, ed é frequentemente mutato in tumori umani. Recentemente, c'è stato un aumentato interesse per le fosfatasi che possono inattivare AKT, inclusa PHLLP.

Il recettore tirosina chinasi attiva anche il complesso 2 di mTOR (mTORC2), attraverso un meccanismo a tutt'oggi sconosciuto, e mTORC2 fosforila AKT sul residuo idrofobico S473, che può essere defosforilato dalla S473 fosfatasi PHLLP (Vadlakonda et al., 2013). AKT attiva il complesso 1 di mTOR (mTORC1) attraverso la fosforilazione di molti siti di TSC2 che fa parte del complesso TSC1-TSC2, e questo blocca l'abilità di TSC2 di agire come una GTPase-activating

protein (GAP) per Rheb, permettendo quindi a Rheb-GTP di accumularsi. Rheb-GTP attiva mTORC1, che fosforila i suoi target a valle come 4E-BP1 e il motivo idrofobico su S6 chinasi, che fosforila la proteina ribosomale S6. AKT può anche attivare mTORC1 fosforilando PRAS40, in questo modo rilascia l'inibizione mediata da PRAS40 su mTORC1. Una volta attivi, sia mTORC1 che S6K, possono fosforilare residui di serina su IRS1, che la predispone alla degradazione, e questo agisce come un feedback negativo per attenuare il signaling di PI3K-AKT.

La separazione di mTOR in due diversi complessi permette a questa proteina chinasi di coordinare una moltitudine di segnali a monte, spaziando dalla stimolazione da parte dei nutrienti a quella dei recettori dei fattori di crescita con una vasta gamma di risposte a valle (Abraham and Gibbons, 2007). L'elemento che caratterizza il complesso mTORC1 è la subunità regolatoria Raptor (Kim and Sabatini, 2004). Il complesso mTORC1 svolge molte delle funzioni di signaling primordiale di mTOR, principalmente quelle correlate all'accumulazione delle riserve energetiche con l'approvvigionamento di amminoacidi e precursori energetici per la sintesi proteica. Per questo motivo non è sorprendente che due dei maggiori substrati di mTORC1 (4E-BP1 e S6K1), siano componenti del macchinario di controllo della traduzione (Gingras et al., 2001; Harris and Lawrence, 2003). La fosforilazione di queste due proteine da parte di mTOR promuove rispettivamente la traduzione dipendente dal cap e la biogenesi dei ribosomi. L'inibizione della funzione di mTORC1 da parte della rapamicina risulta in una lieve diminuzione della sintesi proteica e delle dimensioni cellulari nella maggior parte delle cellule di mammifero (Fingar and Blenis, 2004; Fingar et al., 2002).

6. Spine dendritiche

Nel cervello in via di sviluppo, le arborizzazioni dendritiche e le spine dendritiche si formano e scompaiono rapidamente. Al contrario, la maggior parte dei dendriti e delle spine nel cervello adulto sono stabili per mesi, anni, e addirittura decenni. Ci sono emergenti evidenze che proprio la stabilità di dendriti e spine giochi un ruolo cruciale nel corretto funzionamento del cervello adulto, e che la perdita di stabilità sia associata a disordini psichiatrici e malattie neurodegenerative (Koleske, 2013).

Durante lo sviluppo i dendriti vanno incontro a continui cambiamenti dinamici: estendendo e ritraendo prolungamenti via via che maturano, facilitano le connessioni sinaptiche e stabiliscono i circuiti neuronali, dei quali solo una parte si stabilizzerà (Dailey and Smith, 1996). La dimensione e la forma dell'arborizzazione dendritica di un neurone determina il numero e la distribuzione dei contatti sinaptici recettivi che può avere con le sue afferenze.

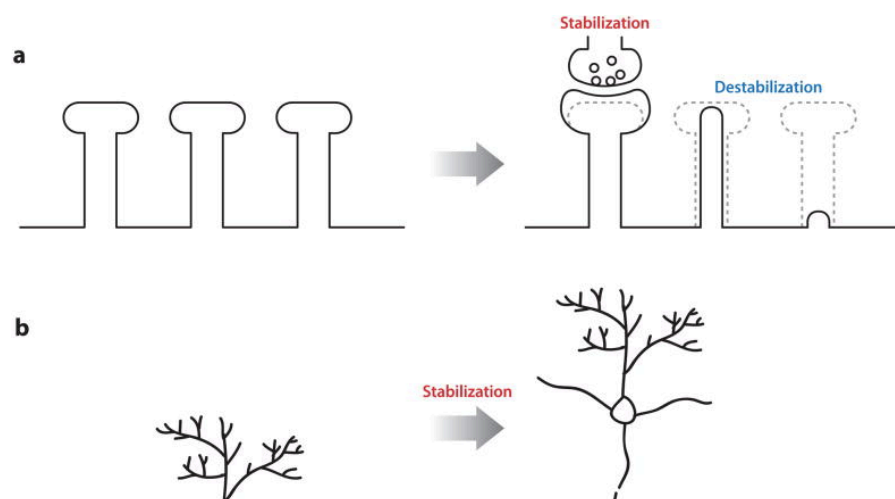


Figura 5. (Koleske, 2013) **Stabilizzazione delle spine dendritiche.**

(a) La stabilità delle spine è aumentata dall'attività sinaptica, dal signaling delle neurotrofine tra i due compartimenti, e dai contatti di adesione.

(b) Il supporto sinaptico mantiene l'integrità dell'architettura dendritica nel tempo. La perdita di questo supporto risulta in una destabilizzazione delle spine dendritiche seguita da una semplificazione delle arborizzazioni.

La plasticità strutturale dei dendriti diminuisce enormemente con la maturazione del circuito. Prima si stabilizza la maggior parte dei dendriti, mentre le spine continuano a formarsi e a mutare forma via via che il circuito si rifinisce (Oray et al., 2004). Questo è seguito da un processo di diminuzione delle spine e delle sinapsi che può durare fino all'adolescenza o all'età adulta in alcune regioni cerebrali (Holtmaat et al., 2005; Yang et al., 2009).

Le spine dendritiche possono avere diverse forme: sottili, corte e tozze, a forma di fungo, o sono formate da una testa posta su un collo sottile (Harris, 1999; Tashiro and Yuste, 2003). Il citoscheletro delle spine (spinoscheletro) è composto da una rete di actina lineare e ramificata, che determina la forma delle spine, guida i cambiamenti di morfologia, mantiene la loro stabilità e organizza il macchinario post-sinaptico (Fifková and Delay, 1982; Hotulainen and Hoogenraad, 2010).

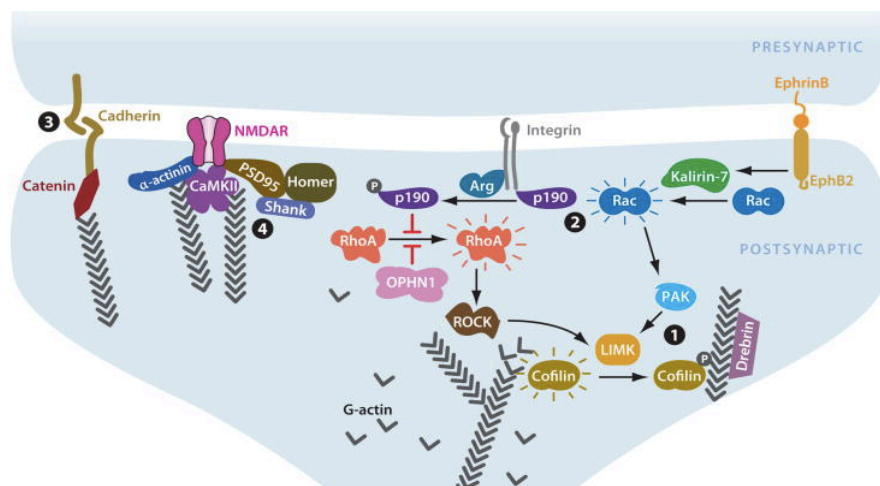


Figura 6. (Koleske, 2013) **Meccanismi molecolari che regolano la stabilità delle spine dendritiche.**

Il mantenimento a lungo termine della sinapsi è garantito dal citoscheletro di actina e dai suoi regolatori, recettori di adesione e dalle "scaffolding proteins".

La maggior parte delle vie di signaling regola la stabilità delle spine o direttamente **(1)** o indirettamente **(2)** (attraverso la via Rho GTPasi) regolando la dinamica dell'actina o le sue interazioni con le molecole di adesione e "scaffolding".

(3) Le molecole di adesione mediano il signaling dal compartimento presinaptico o extracellulare nelle spine dendritiche, causando cambiamenti in Rho-GTPasi e in altre cascate di segnale che controllano la struttura della F-actina e la sua stabilità.

(4) Le proteine scaffolding interagiscono direttamente con la F-actina per supportare la struttura del citoscheletro e organizzare le molecole segnale che impattano su questi meccanismi di controllo.

PSD-95 (Post-Synaptic Density-95) è la più importante proteina scaffolding della densità post-sinaptica, e appartiene alla famiglia MAGUK (Membrane-Associated GUanylate Kinase) (Cho et al., 1992). PSD-95 contiene vari domini PDZ e altri domini di interazione proteina-proteina che stabilizzano l'interazione tra il recettore per il neurotrasmettitore, i recettori di adesione sinaptica, e le molecole di scaffolding associate all'actina (Ethell and Pasquale, 2005).

Il knockdown di PSD-95 in colture di neuroni risulta nella riduzione della densità e dimensione delle spine. PSD-95 sembra essere particolarmente importante per la stabilizzazione delle sinapsi attività dipendente (Ehrlich et al., 2007).

7. Neurotrofine come possibile terapia per la sindrome di Rett

Un fattore di crescita promettente per la terapia nel sistema nervoso centrale è IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1). Come BDNF, IGF-1 è espresso ampiamente nel SNC durante il normale sviluppo (D'Ercole et al., 1996), promuovendo fortemente la sopravvivenza neuronale e la maturazione sinaptica (D'Ercole et al., 1996; O'Kusky et al., 2000), e favorendo il fenomeno della plasticità nella corteccia in sviluppo (Tropea et al., 2006).

IGF-1 stimola gli stessi pathways di BDNF (Tropea et al., 2006; Zheng and Quirion, 2004), che promuove il rafforzamento delle sinapsi attraverso una via che coinvolge PI3K/pAKT/PSD-95 (Yoshii and Constantine-Paton, 2007) e il signaling di ERK (Carvalho et al., 2008).

Contrariamente a BDNF, IGF-1 è in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica (Pini et al., 2012), facilitandone la somministrazione.

L'azione biologica di IGF-1 è regolata anche dal legame con le IGF binding proteins (IGFBP1–6). IGFBP3, ad esempio, ha un sito di legame per la proteina MECP2 (Chang et al., 2004), e sia topi MECP2 KO che pazienti RTT esprimono livelli troppo alti di IGFBP3 (Itoh et al., 2007), che potrebbe risultare in un'inibizione del signaling di IGF-1.

Il diminuito signaling di IGF-1 è stato implicato nei disturbi dello spettro autistico (Riikonen et al., 2006): studi pregressi hanno dimostrato che la concentrazione di IGF-1 è ridotta nel fluido cerebrospinale di bambini autistici (Vanhala et al., 2001), e studi più recenti dimostrano che topi MECP2 KO condividono lo stesso deficit (Castro et al., 2014).

L'IGF-1 (mecasermin) è stato approvato dalla FDA (Food and Drug Administration) come trattamento per i difetti della crescita (sindrome di Laron) (Backeljauw and Chernausk, 2012), quindi giudicato idoneo per la terapia nell'uomo.

Il gruppo del Prof. Sur ha recentemente testato il mecasermin su 12 bambine con una mutazione in MECP2 (Khwaja et al., 2014), dimostrando che l'IGF-1 è ben tollerato e che migliora alcuni sintomi respiratori e comportamenti ansiosi.

La via di IGF-1 si presenta quindi come uno strumento interessante per colpire dei pathway molecolari chiave e stimolare la maturazione sinaptica revertendo il fenotipo Rett.

Scopo della tesi

Come abbiamo visto nei precedenti capitoli, la sindrome di Rett è una patologia dello sviluppo neuronale caratterizzata da un quadro clinico molto complesso, le cui basi patogenetiche derivano da alterazioni del signaling cellulare che si ripercuotono sul tipo e sul numero delle connessioni sinaptiche.

Lo scopo del mio lavoro di tesi è stato trovare un pathway molecolare coinvolto nella genesi del fenotipo associato alla Rett, in quanto non erano ancora stati individuati dei marker molecolari associati a questa patologia.

Con i nostri esperimenti abbiamo individuato alterazioni nel pathway di AKT/PI3K, sia nel modello di Rett classica, in cui si ha una mutazione nel gene MECP2, che in un altro, più recente, in cui si ha una mutazione nel gene CDKL5. Per nostra conoscenza, questa è la prima volta che una cascata di segnale con una funzione pleiotropica nel controllo dell'omeostasi cellulare risulta essere alterata nella sindrome di Rett.

Questi difetti molecolari possono essere responsabili almeno in parte del ridotto numero di sinapsi ippocampali eccitatorie descritto in topi privi di MECP2 (Belichenko et al., 2009; Chao et al., 2007; Fukuda et al., 2005; Tropea et al., 2009).

Partendo da questi presupposti siamo andati a ricercare se anche nel modello CDKL5 ci fossero deficit a livello delle sinapsi, riscontrando una ridotta densità delle spine dendritiche, ma un numero pressochè uguale di filopodi.

Per cercare di risanare questa alterazione sinaptica, abbiamo trattato gli animali con il fattore di crescita Insulin-like Growth factor-1 (IGF-1), riuscendo ad aumentare significativamente la densità delle spine dendritiche e la funzionalità sinaptica, quest'ultima valutata in termini di aumento della proteina sinaptica PSD-95.

Questa terapia può avere implicazioni significative per altre malattie del neurosviluppo che hanno fenotipi e meccanismi neurobiologici simili.

Materiali e metodi

8. Studio del gene MECP2

Il modello murino che abbiamo utilizzato per i nostri esperimenti è stato creato nel laboratorio del Prof. Rudolf Jaenisch del Massachusetts Institute of Technology (Chen et al., 2001).

8.1 Animali

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con le direttive europee per il trattamento degli animali, utilizzati in accordo con i protocolli approvati dal Ministero Italiano per la ricerca scientifica.

Per ottenere gli animali usati per questo studio abbiamo incrociato femmine eterozigoti MECP2 tml.1Jae con la delezione dell'esone 3 in MECP2 (Chen et al., 2001) con maschi C57BL6 per una generazione, in seguito abbiamo incrociato la prole.

I fratelli wild-type della stessa età sono stati usati come controlli.

8.2 Western blotting

I tessuti cerebrali sono stati estratti dal cranio e omogenati nel lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP40, 0.1% SDS e un mix di inibitori di fosfatasi e proteasi della Sigma-Aldrich) a 4°C. I lisati sono stati centrifugati per 15 min a 18000xg, e la concentrazione proteica del surnatante è stata determinata usando l'albumina di siero bovino (BSA) come standard (Bradford reagent assay, Sigma-Aldrich). I lisati totali sono stati bolliti in SDS sample buffer, separati con SDS-PAGE e trasferiti su filtro di nitrocellulosa (Amersham). I filtri sono stati bloccati in tris-buffered saline Tween-20 (0.1%) (TBST) (10mM Tris-HCl, pH

8.0, 150mM NaCl e 0.05% Tween-20) più 5% BSA (Sigma-Aldrich) e incubati con l'anticorpo primario 16h a 4°C. Sono stati usati i seguenti anticorpi primari: rabbit polyclonal anti-phospho-AKT (Ser473) (1:1000, Cell Signaling Technology), mouse monoclonal anti-p-ERK-1&2 (1:1000, Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti-non-phosphorylated ERK-1&2 (1:1000, Sigma-Aldrich), mouse monoclonal anti- β -actin (1:5000, Sigma-Aldrich) e anti- β -tubulin (1:5000, Sigma-Aldrich). Dopo tre lavaggi in TBST, i filtri sono stati incubati con anticorpi secondari coniugati alla perossidasi (anti-mouse o rabbit IgG; 1:5000) (Amersham) per 1 h a temperatura ambiente. La rivelazione è stata effettuata con il metodo della chemiluminescenza (EuroClone, Pero, Italy). Per le misure quantitative sono state fatte autoradiografie da cui è stata misurata l'intensità del segnale con il software ImageJ (NIH).

9. Studio del gene CDKL5

Il modello animale utilizzato per questo lavoro è stato realizzato dal gruppo del Prof. Cornelius Gross, dell'istituto EMBL di Roma (Amendola et al., 2014).

9.1 Animali

Tutti gli animali sono stati utilizzati seguendo i protocolli approvati dal Ministero Italiano della Salute, e in modo coerente alle linee guida dell'NIH (National Institutes of Health) per il trattamento etico degli animali.

Gli animali per gli esperimenti sono stati ottenuti attraverso l'incrocio di femmine $Cdk15^{-/+}$ con $Cdk15^{-/Y}$ e femmine $Cdk15^{-/X}$ con maschi $^{+/Y}$. Gli altri animali della nidiata sono stati usati come controllo.

9.2 Immunoistochimica

Gli animali sono stati anestetizzati con cloralio idrato e perfusi transcardiacamente con paraformaldeide fredda al 4% in buffer fosfato 0.1M (PB, pH 7.4). Dopo la perfusione, i cervelli sono stati dissezionati e tenuti nella stessa soluzione di fissativo overnight a 4°C. Dopo vari lavaggi in PB 0.1M, i cervelli sono stati crioprotetti con immersioni in soluzioni di saccarosio al 10%, 20%, e 30%. Un emisfero cerebrale è stato tagliato in sezioni di 30mm con un criostato, raccolto in PBS (phosphate buffered saline) e processato per la immunoistochimica "free-floating" come descritto (Ricciardi et al., 2011). Dopo un passaggio in PBS, 10% NGS, 0.05% Triton X-100 le sezioni sono state incubate overnight a temperatura ambiente con i seguenti anticorpi primari: rabbit anti-phospho-rpS6 (235/236) XP (1:200); rabbit anti-phospho-rpS6 (240/244) XP (1:800); rabbit anti-rpS6 (1:100; Cell Signaling Technology) diluiti in PBS, 3% NGS, 0.05% Triton X-100. Le sezioni sono state lavate in PBS, incubate per 1 ora con anticorpi secondari goat anti-rabbit biotinilati (1:250; Vector Labs, Burlingame, CA) e trasferite in una soluzione contenente un complesso biotina-avidina (1:100, Vector Labs). Il prodotto della reazione di perossidasi è stato visualizzato attraverso l'incubazione in una soluzione contenente 3,3'-diaminobenzidina (0.05% DAB in Tris- HCl, pH 7.6) con 0.01% H₂O₂ per 3 min. Le sezioni sono state montate su vetrini ricoperti di gelatina e osservati con un microscopio ottico (Eclipse 800, Nikon, Tokyo, Japan) equipaggiato con una CCD camera (Axiocam HRc, Zeiss, Jena, Germany). La quantificazione degli esperimenti di immunolabeling è stata effettuata con misure di densità ottica (OD) con ImageJ da un operatore che non conosceva il genotipo. Misure della densità ottica in corteccia sono state ottenute da boxes di 100x50 mm posizionati a caso in ogni strato corticale.

9.3 Western blotting

I topi a P60 sono stati sacrificati per decapitazione e i cervelli sono stati rapidamente raccolti in ghiaccio. Per la preparazione di estratti ippocampali di topi a P19, i tessuti sono stati omogenati in RIPA buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, Triton X-100 1%, SDS 0,1%, sodium deoxycholate 0,5%, PMSF 1mM, protease and phosphatase inhibitors cocktail, 1% (Sigma)). Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE, trasferite su membrane di nitrocellulosa, bloccate in 5% milk, TBS, 0.1% Tween, e incubate con i seguenti anticorpi: anti-AKT (1:1000), anti-p-AKT (1:1000), e anti- β tubulina (1:5000; Sigma-Aldrich) overnight a 4°C, incubate con l'anticorpo secondario (1 h a temperatura ambiente), e sviluppate usando la rivelazione con ECL (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK), le immagini sono state acquisite e quantificate usando una camera digitale (ChemiDoc XRS+ System, BioRad, Hercules, CA).

9.4 Imaging delle spine

Gli animali utilizzati negli esperimenti sono mantenuti in stabularizzazione seguendo le norme del Ministero Italiano della Salute con accesso ad acqua e cibo ad libitum.

I topi utilizzati negli esperimenti sono topi CDKL5^{-/-} incrociati con topi C57BL/6 thyl-GFP-M (Feng et al., 2000) ottenuti dal Jackson Laboratory. Il genotipo è stato evidenziato mediante PCR.

Tutti i gruppi sperimentali sono composti da animali transgenici Thy-1 GFP di sesso maschile portatori della delezione della proteina CDKL5^{-/-} (topi KO) e non portatori della delezione della proteina CDKL5^{+/+} (topi WT).

Gli animali sono stati divisi in due gruppi sperimentali:

1. Animali a P27 (post-natal day 27) con cranio assottigliato (thinned skull) per lo studio della densità delle spine dendritiche: 35 dendriti di 14 topi WT e 28 dendriti di 15 topi KO;

2. Animali a P27 per l'analisi della proteina PSD-95 tramite la tecnica del Western blotting: 9 topi WT trattati con soluzione fisiologica, 7 topi WT trattati con IGF-1, 8 topi KO trattati con soluzione fisiologica, 8 topi KO trattati con IGF-1.

9.5 Chirurgia nel topo durante lo sviluppo (P27)

Per acquisire immagini delle spine dendritiche della corteccia somatosensoriale, gli animali sono stati sottoposti alla tecnica dell'assottigliamento del cranio (thinned skull) (Yang et al., 2010).

La chirurgia è stata svolta sotto anestesia, ottenuta mediante iniezione intraperitoneale di avertina in soluzione fisiologica (dosaggio 1mL / 50g di peso corporeo).

La chirurgia è stata effettuata con l'aiuto di un microscopio stereoscopico. Dopo che il cranio è stato esposto con un'incisione dello scalpo, l'osso cranico è stato assottigliato a livello della corteccia somatosensoriale destra fino a raggiungere uno spessore di circa 20-50 μ m (3.5mm anteroposteriore rispetto a Bregma e 1.5mm lateralmente) (Figura 7A) mediante limatura con punta arrotondata di trapano da chirurgia. Tale tipo di operazione viene intervallata da ripetuti lavaggi della superficie assottigliata con soluzione salina sterile e fredda per evitare che l'osso si riscaldi provocando infiammazione della corteccia sottostante.

In tutto la chirurgia dura 1-2 ore e l'imaging viene effettuato immediatamente.

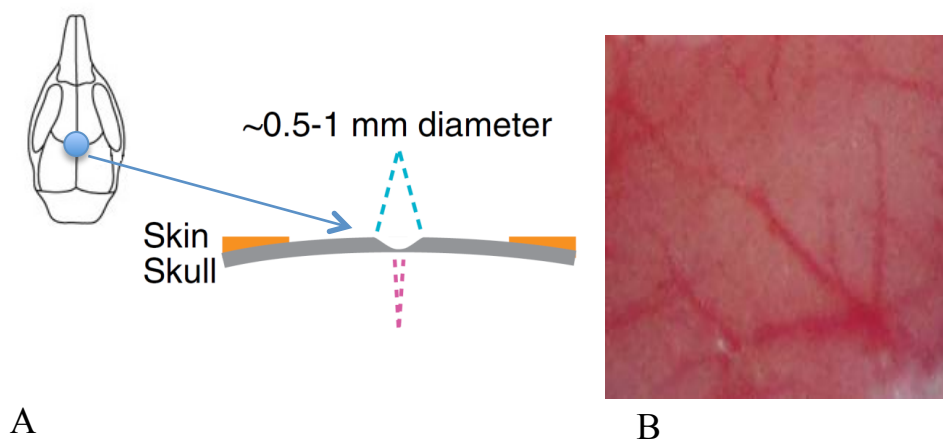


Figura 7. Rappresentazione della tecnica del Thinned-skull.

(A) L'assottigliamento dell'osso cranico viene eseguito su una porzione di 0.5-1 mm di diametro circa. (B) Ingrandimento di un'area assottigliata in cui sono ben visibili i vasi sanguigni.

9.6 Imaging *in vivo*

Per la visualizzazione delle spine dendritiche è stato utilizzato un microscopio a due fotoni sviluppato da un microscopio confocale Olympus Fluoview equipaggiato con laser 5W (Coherent) sintonizzato a 890 nm. Le immagini sono state ottenute mediante l'utilizzo di un obiettivo ad immersione (Olympus 20X, NA 0,95) e una risoluzione massima di 1024 X 1024 pixels con zoom 10.

I dendriti selezionati sono i dendriti apicali dei neuroni piramidali dello strato V presenti negli strati II/III a livello della corteccia somatosensoriale (50-100 μm sotto la superficie corticale). La vascolatura della zona in cui sono visualizzati i dendriti di interesse è stata fotografata con una CCD camera (Figura 8B) in maniera da poter riconoscere gli stessi dendriti durante le successive sessioni di imaging.

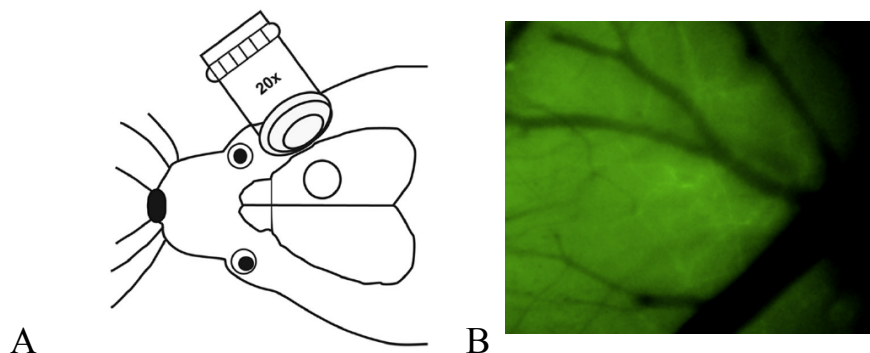


Figura 8. Imaging *in vivo*. (A) Rappresentazione schematica di un topo sottoposto a imaging a livello della corteccia somatosensoriale destra. (B) Immagine della zona di interesse con vascolatura ottenuta con telecamera CCD in fluorescenza.

9.7 Trattamento con IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1)

Sono state effettuate iniezioni subcutanee di IGF-1 (IU100; 1.8 µg/g di peso corporeo; Biovision) in topi CDKL5 WT e KO. Abbiamo iniettato una singola dose di questo fattore di crescita per 4 giorni consecutivi, da P24 a P28, e l'imaging è stato effettuato tra P27 e P28.

I gruppi sperimentali sono i seguenti:

1. WT trattati con soluzione fisiologica: analizzati 27 dendriti di 6 topi
2. WT trattati con IGF-1: analizzati 20 dendriti di 7 topi
3. KO trattati con soluzione fisiologica: analizzati 25 dendriti di 8 topi
4. KO trattati con IGF-1: analizzati 40 dendriti di 12 topi

Le iniezioni sono state effettuate utilizzando un catetere con un ago di calibro 20 connesso ad una siringa Hamilton.

9.8 Isolamento dei sinaptosomi per la quantificazione di PSD-95

Topi CDKL5 WT e KO sono stati sacrificati per decapitazione a P30, la porzione di area corticale relativa alla corteccia somatosensoriale è stata prelevata, pesata e raccolta in apposite provette.

Ad ogni campione è stato aggiunto un buffer di lisi, costituito da saccarosio 0,32M ed HEPES 1X a pH 7,4. Il tessuto è stato omogenato con un pestello meccanico in teflon-vetro a 950 giri. L'omogenato è stato poi sottoposto ad una serie di centrifugazioni per l'isolamento della frazione sinaptosomale.

Dalla prima centrifugazione (1400xg, 15 min, 4°C) si ottiene il precipitato (pellet) che rappresenta la frazione nucleare. Tale frazione nucleare viene risospesa nel buffer di lisi e centrifugata (13800xg, 15min, 4°C) per ottenere la "frazione sinaptosomale cruda". Si prosegue con un lavaggio in buffer di lisi e successiva centrifugazione (3700xg, 20 min, 4°C). Il nuovo pellet viene risospeso in 10 µl di buffer (Paris) e rappresenta la frazione sinaptosomale, che viene conservata a -80°C.

9.9 Western blotting

La concentrazione proteica della frazione sinaptosomale è stata determinata con il kit Bio-Rad.

Per ogni campione sono stati utilizzati 20 µg di proteine per l'elettroforesi su gel Precast di acrilammide al 12% (Biorad), dopo l'aggiunta dell'agente riducente (Biorad) e del loading buffer (Biorad). L'elettroforesi è stata effettuata a 200 V per 60 min, mentre il trasferimento delle proteine sul filtro di nitrocellulosa è stato effettuato a 100 V per 30 min.

A questo punto i filtri sono stati incubati prima in una soluzione bloccante (blocking solution Odyssey) per due ore, e poi in una soluzione contenente l'anticorpo primario: PSD-95 (anti-mouse 1:500, Abcam) e la β -tubulina (Anti-mouse 1:3000, Sigma) per 12 ore a 4°C.

A questo punto i filtri sono stati sottoposti a 4 lavaggi di 5 min in PBS+0,1% Tween-20, e incubati con un anticorpo secondario (IRDye 800CW Goat anti-mouse, IRDye 680 LT Goat anti-mouse) per 1 h a temperatura ambiente.

Dopo altri 4 lavaggi di 5 min in PBS+Tween-20 in agitazione, le membrane vengono conservate in PBS. Il segnale è stato rivelato col metodo Odyssey.

10. Processamento delle immagini e analisi dati

L'analisi delle immagini è stata effettuata utilizzando il software Image J.

Le immagini utilizzate sono proiezioni 3D lungo l'asse Z, e le spine dendritiche sono state contate manualmente attraverso lo scorrimento lungo queste proiezioni.

Il parametro che abbiamo considerato è la densità delle spine, espressa come N_{tot} spine/ lunghezza del dendrite espressa in μm .

11. Analisi statistica

I dati ottenuti dagli esperimenti sono stati espressi come media rispetto ai controlli più o meno errore standard dalla media (SEM). I programmi utilizzati per l'analisi statistica sono Origin 7 e SigmaStat.

Risultati

Nel mio lavoro di tesi abbiamo analizzato la via di AKT in modelli murini della sindrome di Rett. La famiglia di Ser/thr chinasi AKT è di importanza critica per quanto riguarda le vie di segnalazione dei fattori di crescita, la proliferazione cellulare, la sopravvivenza e l'oncogenesi.

L'attivazione del recettore induce la chinasi lipidica, PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K), ad attivare AKT. In risposta alla via di PI3K/AKT troviamo mammalian target of rapamycin (mTOR), uno dei maggiori effettori implicati nella regolazione della crescita cellulare, metabolismo, ed è inoltre cruciale per l'organizzazione sinaptica, che controlla attraverso la regolazione della sintesi proteica (Abraham, 2009). Sono state riscontrate sue alterazioni in altre patologie del neurosviluppo come l'X-fragile ed un'ampia gamma di malattie incluse il cancro, la sclerosi tuberosa, il diabete e malattie cardiovascolari. Queste chinasi mediano l'attività di una moltitudine di segnali intracellulari e interagiscono con molti pathways che regolano i processi cellulari (Altomare and Khaled, 2012).

Inizialmente abbiamo studiato la forma classica della malattia, in cui si osserva una mutazione nel gene MECP2. Questo gene funziona da regolatore della trascrizione ed è implicato sia nel pattern dei dendriti che nella morfogenesi delle spine (Zhou et al., 2006).

Successivamente siamo andati a studiare una forma della malattia in un altro modello murino, che reca la delezione nel gene CDKL5. Di questo gene sappiamo ancora poco, ma è stato interessante ricercare similitudini e differenze con la forma più conclamata della malattia.

12. Il modello MECP2

12.1 Fosforilazione di S6 nel modello MECP2

Data l'importanza di queste vie cellulari, nel nostro lavoro siamo andati ad indagare se l'attivazione della proteina ribosomale (rp) S6, una componente della subunità ribosomale 40S e target della via di mTOR, fosse normale durante lo sviluppo post-natale del sistema nervoso in topi MECP2 mutati.

In particolare abbiamo analizzato le modifiche che avvengono alle Ser235/236 e Ser240/244 in tessuti cerebrali, come possiamo notare dalla figura.

(Corteccia: p-rpS6-Ser235/236, ridotta di $55.1 \pm 11.1\%$ rispetto al WT, $n=9$, $p=0.001$; p-rpS6-Ser240/244, ridotta di $35.2 \pm 10.7\%$ rispetto al WT, $n=8$ $p=0.009$).

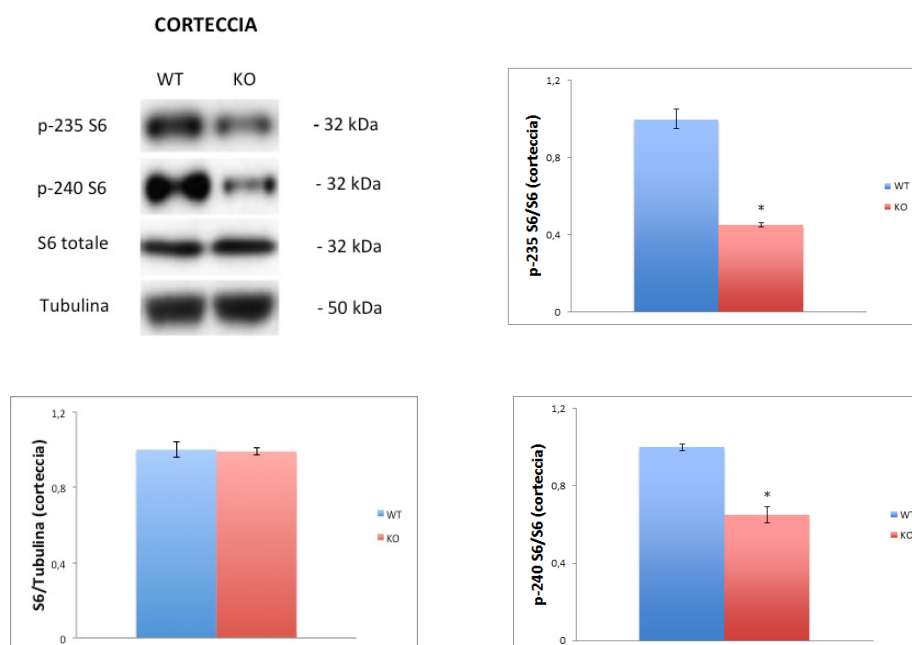


Fig. 9 A

(Cervelletto: p-rpS6-Ser235/236, ridotta di $31.9 \pm 6.5\%$ rispetto al WT, $n=6$, $p=0.005$; p-rpS6-Ser240/244, ridotta di $29.5 \pm 12.6\%$ rispetto al WT, $n=4$, $p=0.002$).

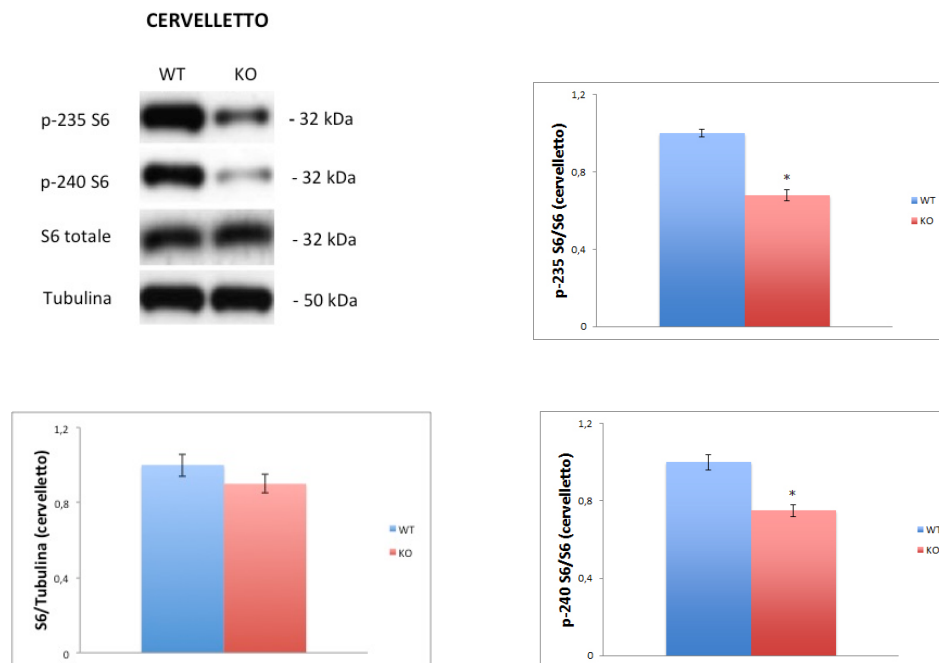


Fig. 9 B

(Ippocampo: p-rpS6-Ser235/236, ridotta di $56.2 \pm 5.6\%$ rispetto al WT, $n=4$, $p=0.02$; p-rpS6-S240/244, ridotta di $68.9 \pm 16.6\%$ rispetto al WT, $n=11$, $p=0.15$).

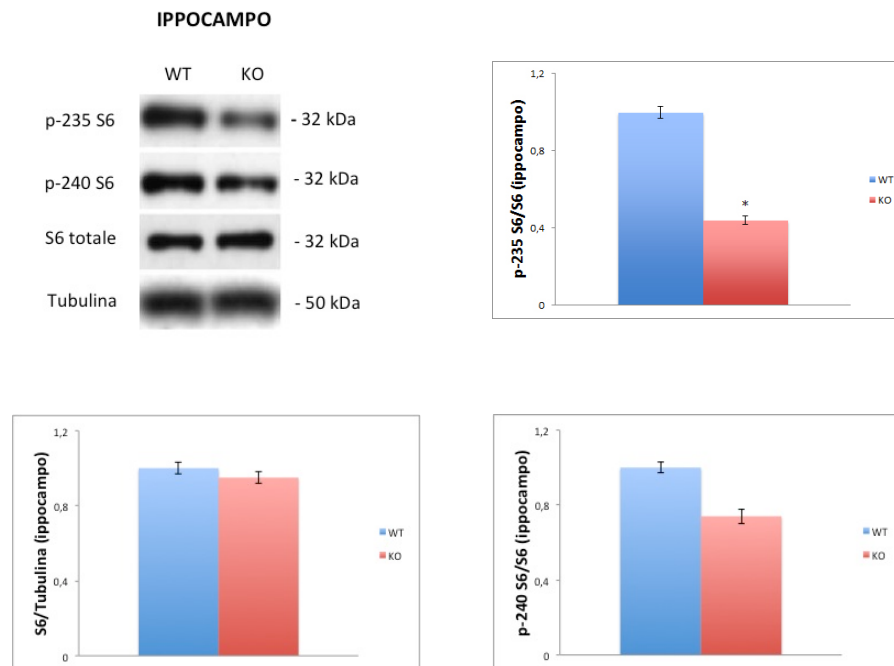


Fig. 9 C

Figura 9.(A, B, C). Riduzione della proteina S6 fosforilata in corteccia, cervelletto e ippocampo di animali MECP2^{-y} a P56.

La quantificazione dei dati ottenuti ha rivelato che la fosforilazione di S6 alla Ser235/236 è ridotta in corteccia, cervelletto e ippocampo di animali MECP2 KO. Per quanto riguarda la fosforilazione di rpS6 in Ser240/244 vediamo che è significativamente ridotta in corteccia e cervelletto, ma non nell'ippocampo. Non abbiamo riscontrato differenze nell'espressione di rpS6 totale.

12.1 Il pathway di ERK nel modello MECP2

Sappiamo che rpS6 può essere attivata sia dalla via di mTOR tramite AKT, che dalla cascata di segnale di RAS-ERK attraverso la fosforilazione da parte di p90RSK esclusivamente nella Ser235/236. Quindi abbiamo esaminato i livelli di attivazione delle chinasi ERK1/2 in neuroni privi di MECP2 per vedere se anche questa via è affetta nella RTT. Come possiamo notare dal western blot e dal relativo grafico, non è stata osservata alcuna differenza nella fosforilazione di ERK negli stessi animali ($94.4 \pm 17\%$ rispetto ai livelli dei WT, $n=11$, $p=0.56$).

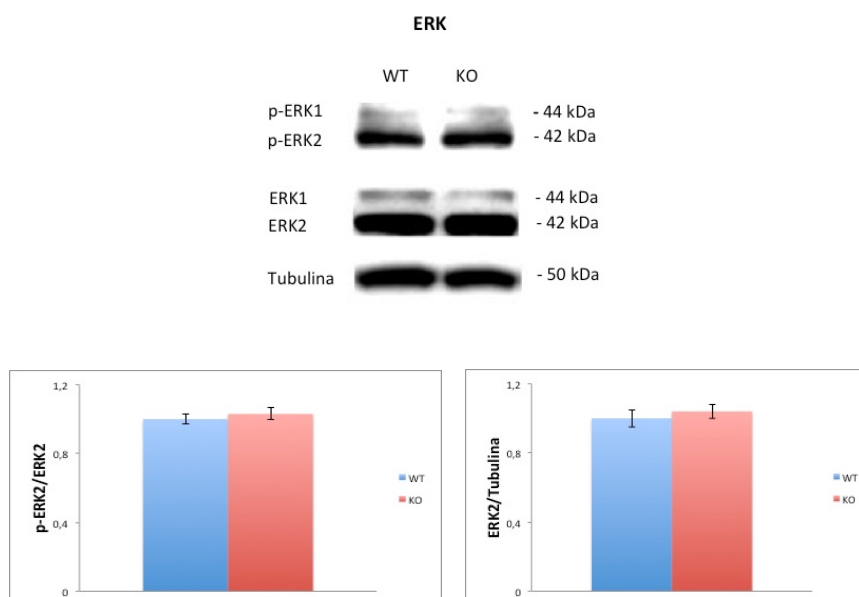


Figura 10. Fosforilazione di ERK in lisati cerebrali di topi a P56.

I western blots mostrano p-ERK ed ERK totale in lisati cerebrali di topi MECP2 KO e WT. La tubulina è stata inclusa come controllo.

Come si nota dai grafici, la quantificazione mostra che non ci sono cambiamenti né in p-ERK2 né in ERK2 in topi MECP2 KO. Dati i livelli di espressione estremamente bassi di ERK1 abbiamo analizzato solo ERK2.

12.3 Fosforilazione di AKT nel modello MECP2

Al contrario della via di ERK, i nostri dati dimostrano che la fosforilazione di AKT in Ser 473 è ridotta nel cervello di topi MECP2^{-/-}, come mostrato in figura. (decremento di $45.7 \pm 9.5\%$ rispetto ai livelli dei WT, $n=10$, $p=0.037$).

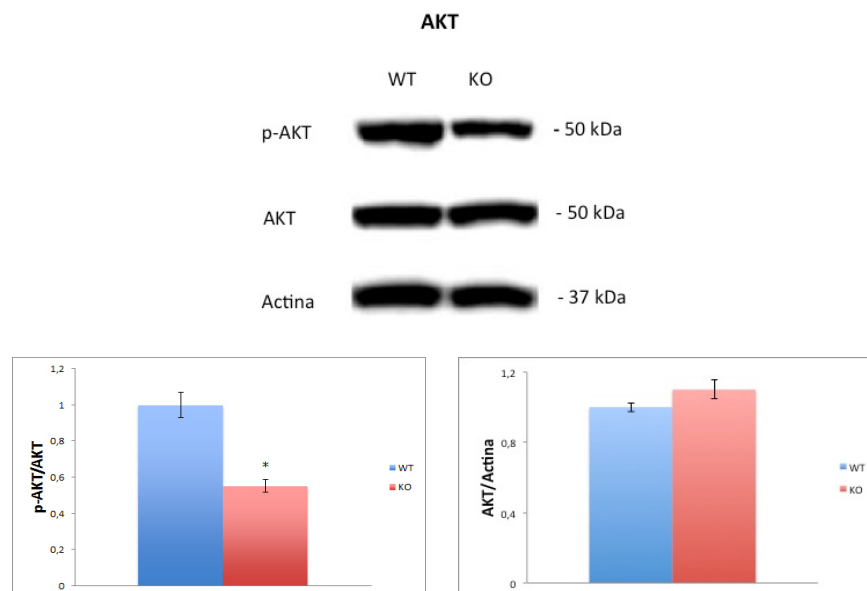


Figura 11. Riduzione della fosforilazione di AKT in lisati cerebrali di topi MECP2^{-/-} e WT a P56.

I western blots evidenziano p-AKT e AKT totale in lisati cerebrali di topi MECP2 KO e WT a P56. La quantificazione mostra che i livelli di p-AKT Ser473 sono chiaramente ridotti in topi MECP2 KO.

Non si riscontrano differenze nei livelli di AKT totale ($p < 0.05$).

La differenza nella fosforilazione di AKT sembra si possa attribuire ad alterazioni nell'attivazione dello stato basale, poichè la quantità di AKT totale non differisce significativamente nel mutante rispetto ai fratelli WT.

In definitiva, questi risultati provano una disfunzione generale della via di AKT/mTOR in cervelli di topi MECP2 mutanti, associata al progredire della malattia.

13. Deficit nel signaling cellulare in topi CDKL5 KO

Considerati i risultati ottenuti, ci siamo chiesti se la via di AKT/mTOR fosse affetta anche nel modello di Rett atipica scoperto da Hanefeld, in cui si ha una mutazione nel gene CDKL5.

13.1 Deficit nella via di AKT nel modello CDKL5

Come mostrato in figura, i western blots eseguiti su estratti proteici di ippocampo nei 5 gruppi sperimentali (femmine WT, eterozigoti e KO e maschi WT e KO) hanno rivelato un diminuito livello di AKT fosforilata nei topi CDKL5^{-y} rispetto ai WT. (X/X, n=4; -/X, n=6/8; -/-, n=6; X/Y, n=3; -/Y, n=5).

La quantificazione del western blot rileva un significativo decremento nell'immunoreattività a p-AKT nei mutanti CDKL5 in confronto ai WT.

(Femmine: WT, n=10, ET, n=6, KO, n=10; maschi: WT, n=5, KO, n=6; mean±SEM) (mean±SEM; *p<0.05).

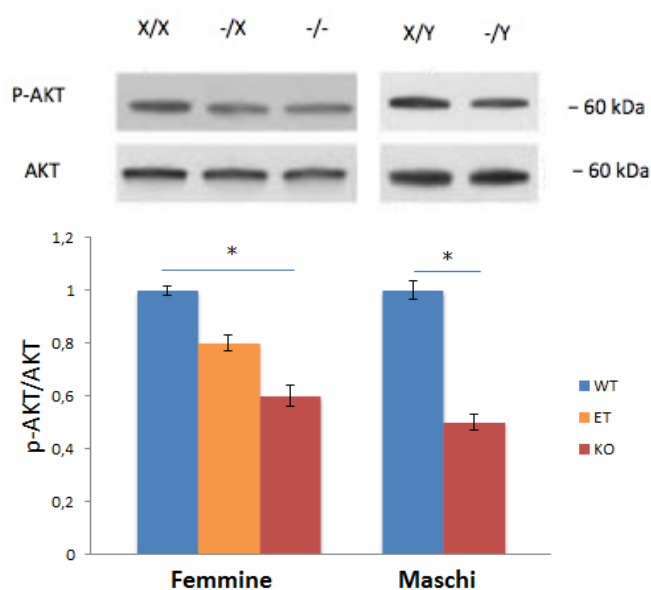


Figura 12. Riduzione della fosforilazione di AKT in estratti proteici ippocampali di femmine e maschi CDKL5 WT, eterozigoti e KO a P19.

Dai nostri esperimenti possiamo notare una riduzione della fosforilazione di AKT in modo proporzionale al genotipo.

13.2 Fosforilazione di S6 nel modello CDKL5

Come riportato per il modello MECP2, abbiamo constatato, tramite un'analisi di strati corticali, che i livelli di rpS6 fosforilata in posizione 240/244 sono significativamente ridotti nella corteccia somatosensoriale di femmine e maschi mutati rispetto ai WT. Anche per quanto riguarda la fosforilazione di S6 in posizione 235/236 c'è una tendenza di riduzione nel mutante, come mostrato in figura. (X/X, n=4; -/X, n=6; -/-, n= 3; X/Y, n= 4; -/Y, n=4; *p<0.05, **p<0.01).

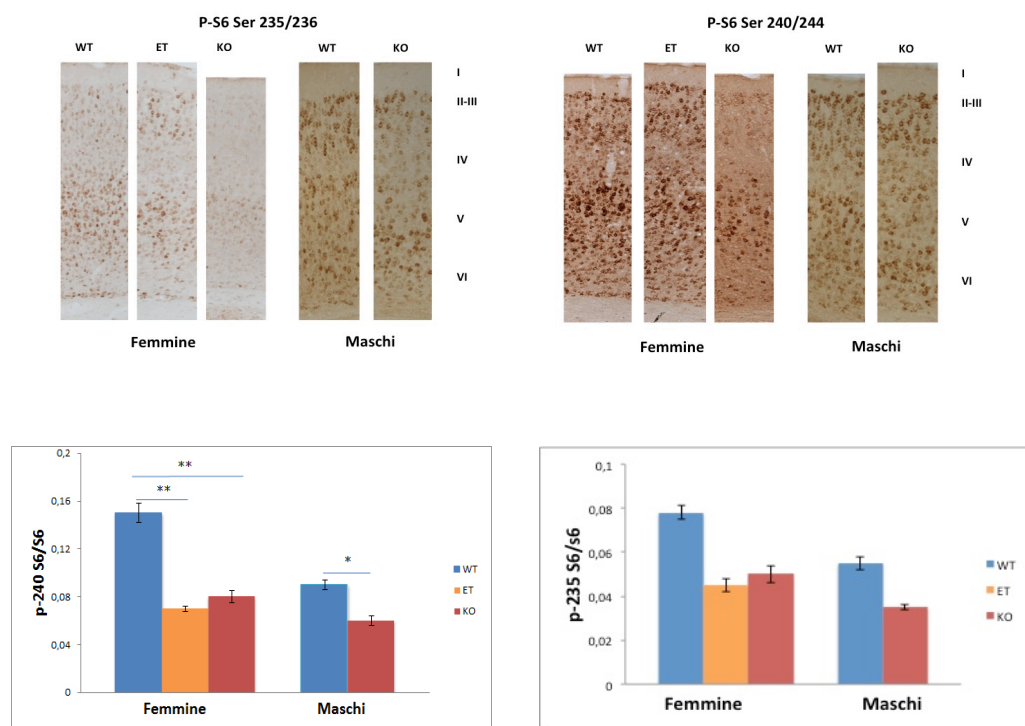


Figura 13. Riduzione della fosforilazione di S6 in Ser240/244-Ser235/236 negli strati II–III e V di topi mutanti maschi e femmine a P19, in confronto ai controlli WT.

E' stata osservata una riduzione significativa della fosforilazione alla Ser240/244 e un trend di ridotta fosforilazione alla Ser235/236 di rpS6 negli strati II–III e V di topi mutanti maschi e femmine rispetto ai controlli.

14. Spine dendritiche nel modello CDKL5

Considerato che CDKL5 sembra essere importante per un normale sviluppo cerebrale, abbiamo studiato la densità delle spine dendritiche nel periodo dello sviluppo (P27) in topi mutanti e WT. Dai nostri dati risulta un chiaro effetto del genotipo sul numero di spine presenti sui dendriti delle cellule piramidali del V strato (WT=1.36±0.073; KO=1.13±0.074; p=0.034; t(61)=2.13).

Per indagare sulla natura di questo deficit, e considerando l'abbondanza di protrusioni immature simili a filopodi negli animali in sviluppo, abbiamo classificato le protrusioni come spine e filopodi. (Filopodi WT=0.38±0.043; KO=0.39±0.046; p=0.88; t(61)=-0.15).

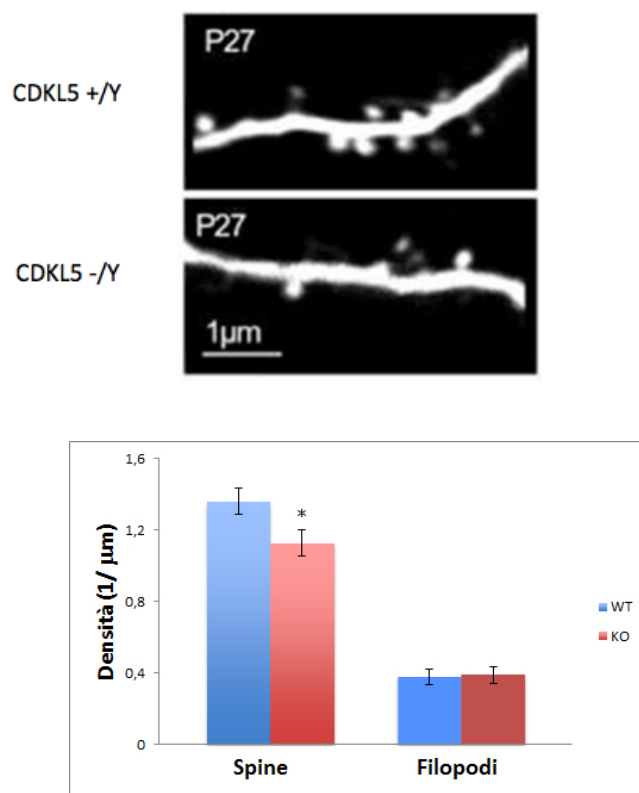


Figura 14. Densità delle spine dendritiche in topi CDKL5^{-y} a P27 rispetto ai WT. I topi CDKL5^{-y} mostrano un numero significativamente inferiore di protrusioni. Come riportato in figura, il numero di filopodi è simile in entrambe i

genotipi, suggerendo che CDKL5 sia coinvolto nella stabilizzazione delle spine con una morfologia matura.

14.1 Densità delle spine in topi CDKL5 KO in seguito al trattamento con IGF-1.

Abbiamo già dimostrato che la mancanza di CDKL5 riduce l'attività del pathway di AKT/mTOR, una cascata di segnale fondamentale per il corretto funzionamento della sinapsi, per la sua struttura e per la plasticità (Amendola et al., 2014) ed è già noto che IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) è un attivatore del pathway di mTOR/AKT (Zheng and Quirion, 2004).

Partendo da questi presupposti abbiamo deciso di trattare gli animali con IGF-1, per capire se questo fattore di crescita potesse recuperare il deficit delle spine dendritiche in topi CDKL5^{-/-}.

I topi CDKL5^{-/-} mostrano una ridotta densità delle spine (spine WT soluz.fis. 1.73 ± 0.07 , spine KO soluz.fis. 1.23 ± 0.065 $p < 0.001$, $t(52) = 4.8$), ma IGF-1 aumenta significativamente la loro densità rispetto ai controlli trattati con soluzione fisiologica (spine KO 1.23 ± 0.065 , spine KO IGF1 1.51 ± 0.086 , $p = 0.024$ $t(65) = -2.31$). Il trattamento con la soluzione fisiologica non cambia la densità delle spine rispetto al non trattato in entrambe i genotipi.

In figura l'imaging delle spine che mostra l'effetto di IGF-1 rispetto al controllo.

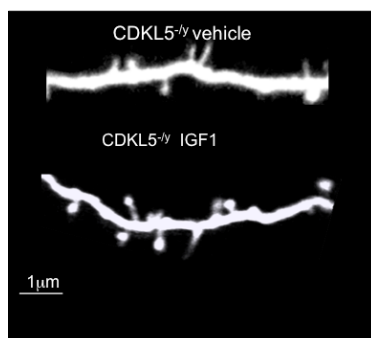


Figura 15. Imaging delle spine che mostra il recupero delle spine dendritiche in un topo a P27 trattato con IGF-1.

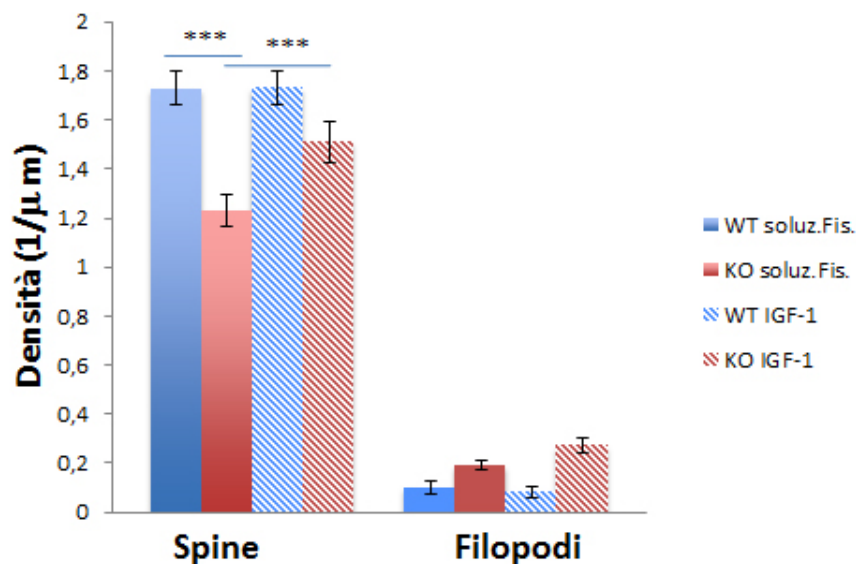


Figura 16. Densità delle spine dendritiche nei 4 gruppi sperimentali: WT e KO, iniettati con soluzione fisiologica o IGF-1.

Possiamo notare una riduzione della densità delle spine nel mutante rispetto al controllo WT, e successivo recupero della loro densità grazie al trattamento con IGF-1.

15. Deficit sinaptico e recupero con IGF-1

Per confermare che il ridotto numero di spine dendritiche corrisponde a una riduzione nell'espressione del marker sinaptico PSD-95, abbiamo quantificato la sua espressione attraverso western blotting in topi WT e KO a P27 in sinaptosomi estratti dalla corteccia somatosensoriale.

In figura possiamo notare l'espressione del marker sinaptico PSD-95 nei 4 gruppi sperimentali: topi WT e KO trattati con la soluzione fisiologica e WT e KO trattati con IGF-1. I nostri dati dimostrano che anche se i topi $CDKL5^{-/-}$ mostrano una ridotta densità delle spine (PSD-95: WT soluz.fis. 1 ± 0.09 ; KO soluz.fis. 0.62 ± 0.11 ; $p=0.017$ $t(15)=-2.66$), IGF1 aumenta significativamente la loro densità rispetto al controllo trattato con soluzione fisiologica (PSD-95: KO soluz.fis. 0.62 ± 0.11 , KO IGF1 1.02 ± 0.14 $p=0.048$ $t(14)=-2.16$).

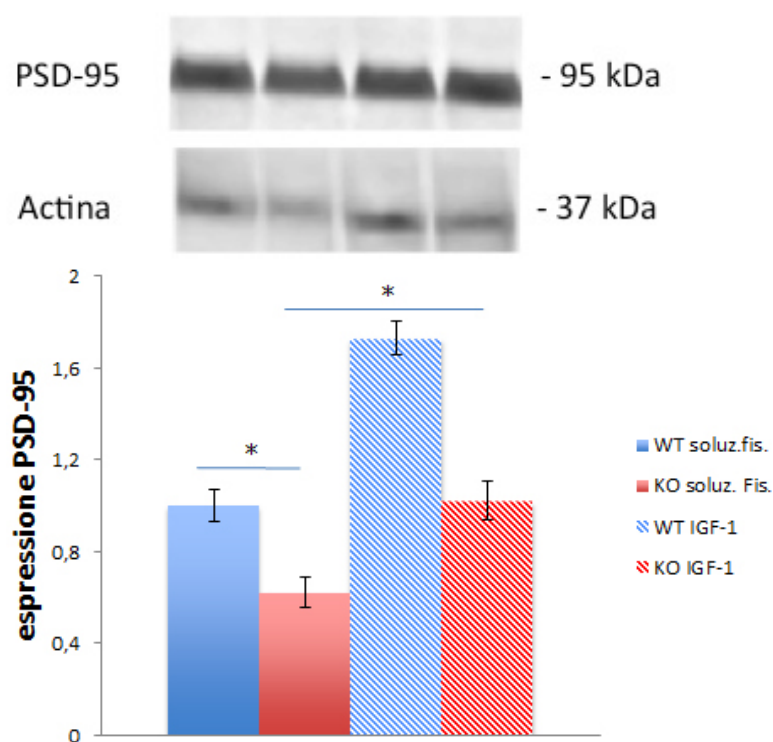


Figura 17. Deficit sinaptico e recupero con IGF-1.

Western blot e relativo grafico che mostrano l'espressione di PSD-95 nei 4 gruppi sperimentali: WT trattati con soluzione fisiologica, KO trattati con soluzione fisiologica, WT trattati con IGF-1, KO trattati con IGF-1.

Possiamo notare un significativo aumento della densità post-sinaptica in seguito al trattamento con IGF-1.

Discussione e Conclusioni

La Sindrome di Rett (RTT) è una grave patologia neurologica dello sviluppo, caratterizzata da deficit cognitivi, disturbi di tipo autistico e dalla progressiva perdita delle abilità acquisite, come la comunicazione verbale, l'uso finalistico delle mani e la deambulazione.

Sebbene in più del 90% dei casi la RTT sia causata da mutazioni nel gene MECP2, recentemente sono state identificate mutazioni nel gene CDKL5 in pazienti ai quali è stata diagnosticata una forma di RTT atipica (Elia et al., 2008).

Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato due modelli animali con fenotipi che si sovrappongono parzialmente: entrambi mostrano il "clasping" delle zampe posteriori, ipoattività, e ridotta arborizzazione dendritica dei neuroni corticali.

Abbiamo dimostrato che entrambe i KO presentano una ridotta fosforilazione di rpS6 e di AKT, una componente fondamentale del signaling delle neurotrofine (Kaplan and Miller, 2000) e modulatore a monte di rpS6 attraverso mTOR (Roux et al., 2007).

Queste scoperte suggeriscono che la sottoregolazione del pathway di rpS6, e la difettiva regolazione traduzionale, possano essere un punto comune tra la sindrome di RTT classica e il disordine legato a CDKL5.

La diversa localizzazione delle due proteine a livello cellulare suggerisce che agiscano attraverso due meccanismi distinti per arrivare a target comuni.

Mentre MECP2 è nucleare e associata all'eterocromatina, CDKL5 è sia citoplasmatica che nucleare, nell'ultimo caso associata agli speckles, strutture granulari che contengono le proteine di splicing (Ricciardi et al., 2009).

Nel modello MECP2 era già stata individuata un'alterata dinamica delle spine dendritiche e filopodi durante lo sviluppo, che impedisce la corretta formazione delle sinapsi e la plasticità (Landi et al., 2011).

Nel nostro laboratorio ci siamo chiesti se anche la mutazione di CDKL5 alterasse la dinamica delle spine dendritiche e, per verificare questa ipotesi, abbiamo studiato la densità di spine e filopodi nel periodo dello sviluppo (P27) in topi mutanti e WT.

I filopodi sono i precursori delle spine dendritiche ed il loro numero é un buon indice della capacità dei neuroni di produrre un primo sito post-sinaptico in risposta a nuove stimolazioni esterne.

Le spine sono i contatti più stabili ed acquisiscono la loro forma finale dopo una fase di stabilizzazione accompagnata da diversi cambiamenti strutturali interni al contatto sinaptico (Hayashi and Majewska, 2005).

I nostri dati indicano che il numero di filopodi é molto simile nei due genotipi, indicando che i processi che producono una prima rapida risposta sinaptica sono indipendenti da CDKL5.

Al contrario, il numero di spine vere e proprie, i contatti più maturi, é inferiore nel modello CDKL5 KO.

Il deficit nella stabilizzazione delle spine é stato confermato anche da altri esperimenti in cui abbiamo misurato i livelli di espressione di PSD-95 (Post-Synaptic Density-95), una proteina post-sinaptica importante per il mantenimento delle sinapsi eccitatorie (Elias and Nicoll, 2007).

Dai risultati ottenuti possiamo evincere che i topi CDKL5 knockout hanno livelli di PSD-95 inferiori rispetto ai wild-type.

Questi dati sembrano essere in accordo con un recente studio, dove é stato dimostrato che la proteina CDKL5 interagisce con il complesso NGL1-PSD-95 per regolare la forza delle sinapsi (Ricciardi et al., 2012).

E' interessante notare come il nostro lavoro suggerisca che CDKL5 sembrerebbe essere coinvolto nella stabilizzazione sinaptica, discostandosi quindi dal modello MECP2 osservato in precedenza dal gruppo di Landi (Landi et al., 2011), che ha dimostrato che nel modello murino della RTT classica la maggiore alterazione é nei pathway che portano alla formazione dei contatti sinaptici.

Quindi, sebbene le mutazioni di MECP2 e CDKL5 portino alla fine entrambe ad una riduzione del numero di spine, il meccanismo di azione potrebbe essere diverso.

Per tentare di recuperare questo deficit, abbiamo trattato gli animali con il fattore di crescita IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), che si era già dimostrato efficace nel modello MECP2 per il recupero della dinamica delle spine e la stabilizzazione dei filopodi (Landi et al., 2011).

L'IGF-1 è un fattore ampiamente espresso nel SNC durante il normale sviluppo, che promuove la sopravvivenza neuronale, la maturazione sinaptica e la plasticità nella corteccia in sviluppo (D'Ercole et al., 1996; O'Kusky et al., 2000).

La relazione tra IGF-1 e RTT è messa in luce dall'osservazione che nel liquor di bambini autistici la concentrazione di IGF-1 è minore (Riikonen et al., 2006).

Inoltre il suo potenziale farmacologico è aumentato dalla sua abilità di oltrepassare la barriera ematoencefalica (Nishijima et al., 2010), proprietà che non è condivisa da altri fattori neurotrofici, come BDNF (Pardridge, 1993; Thoenen and Sendtner, 2002).

La stimolazione del signaling di IGF-1 può aumentare la maturazione e la funzionalità sinaptica e lo può fare attraverso vari meccanismi.

PSD-95 può essere attivata direttamente o indirettamente attraverso PI3K e pAKT (Zheng and Quirion, 2004) ed è interessante notare che lo stesso pathway è stimolato da BDNF (Yoshii and Constantine-Paton, 2007), che è già noto essere efficace nel trattamento del fenotipo RTT (Chang et al., 2006b).

IGF-1 attiva anche un altro pathway stimolato da BDNF, quello di ERK, che è coinvolto nella stabilizzazione sinaptica (Carvalho et al., 2008; Thomas and Huganir, 2004).

E' anche possibile che IGF-1 agisca più direttamente sulla dinamica delle spine, contribuendo alla regolazione dell'actina.

Nelle cellule muscolari è stato dimostrato che IGF-1 modula l'attività di N-WASP, aumentando la formazione dei filamenti di actina (Takano et al., 2010).

Dal momento che N-WASP è anche un regolatore cruciale dell'actina durante la formazione delle spine e la plasticità (Wegner et al., 2008), è possibile che la

motilità actina-dipendente possa essere direttamente influenzata dalla disponibilità di IGF-1.

In conclusione, con il nostro lavoro abbiamo studiato diversi aspetti sia del signaling cellulare che della connettività sinaptica in due forme della sindrome della Rett, apparentemente diverse, ma che in realtà abbiamo scoperto avere molto in comune.

Ringraziamenti

Innanzitutto desidero ringraziare il mio relatore, il Prof. Tommaso Pizzorusso, per avermi dato la possibilità di svolgere il mio internato di tesi nel suo laboratorio e per la disponibilità che mi ha sempre dimostrato. Ringrazio la Prof.ssa Michela Ori e il Prof. Federico Cremisi, i miei correlatori, che grazie ai loro preziosi consigli mi hanno aiutata nella stesura della tesi. Proseguo con un sentito grazie a Elena Putignano, per tutte le cose che mi ha insegnato e per aver reso più piacevole il lavoro.

Un grande ringraziamento lo voglio rivolgere anche all'insostituibile Grazia, che mi ha aiutata in ogni fase del mio percorso senza mai tirarsi indietro, sempre sorridente e con la giusta colonna sonora :).

Grazie a Jonida, Debora e Francesco per avermi fatta sentire fin da subito parte del gruppo, e a Chiara ed Elisa per le "chiacchiere tra gattare".

A Raffaele, amico più che collega, per il supporto psicologico e per avermi insegnato a muovere i miei primi passi -a tutt'oggi gli unici- col Mac.

Grazie a Nicole e Andrea C., i veri informatici, per avermi aiutata a superare il mio ultimo esame!

A Betty e Sara, le mie sorelle, per non aver mai smesso di credere in me.

Ad Andrea, il fidanzato più paziente del mondo, che con il suo amore mi ha sostenuta ed incoraggiata verso questo traguardo.

Ovviamente ringrazio i miei genitori per avermi dato la possibilità di studiare e per aver sempre rispettato le mie decisioni, e i miei nonni, che sono convinti che un giorno scoprirò qualcosa di eccezionale.

Grazie anche a tutti quelli che ho dimenticato di citare, la colpa é delle sinapsi perse con lo stress!

Bibliografia

Abraham, R.T. (2009). Regulation of the mTOR signaling pathway: from laboratory bench to bedside and back again. *F1000 Biol. Rep.* 1.

Abraham, R.T., and Gibbons, J.J. (2007). The mammalian target of rapamycin signaling pathway: twists and turns in the road to cancer therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 3109–3114.

Altomare, D., and Khaled, A. (2012). Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Curr. Med. Chem.* 19, 3748–3762.

Amendola, E., Zhan, Y., Mattucci, C., Castroflorio, E., Calcagno, E., Fuchs, C., Lonetti, G., Silingardi, D., Vyssotski, A.L., Farley, D., et al. (2014). Mapping pathological phenotypes in a mouse model of CDKL5 disorder. *PloS One* 9, e91613.

Ariani, F., Hayek, G., Rondinella, D., Artuso, R., Mencarelli, M.A., Spanhol-Rosseto, A., Pollazzon, M., Buoni, S., Spiga, O., Ricciardi, S., et al. (2008). FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 89–93.

Armstrong, D., Dunn, J.K., Antalffy, B., and Trivedi, R. (1995). Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54, 195–201.

Bahi-Buisson, N., Nectoux, J., Rosas-Vargas, H., Milh, M., Boddaert, N., Girard, B., Cances, C., Ville, D., Afejar, A., Rio, M., et al. (2008). Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain J. Neurol.* 131, 2647–2661.

Bahi-Buisson, N., Villeneuve, N., Caietta, E., Jacquette, A., Maurey, H., Matthijs, G., Van Esch, H., Delahaye, A., Moncla, A., Milh, M., et al. (2012). Recurrent mutations in the CDKL5 gene: genotype-phenotype relationships. *Am. J. Med. Genet. A.* 158A, 1612–1619.

Belichenko, P.V., Oldfors, A., Hagberg, B., and Dahlström, A. (1994). Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport* 5, 1509–1513.

Belichenko, P.V., Wright, E.E., Belichenko, N.P., Masliah, E., Li, H.H., Mobley, W.C., and Francke, U. (2009). Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J. Comp. Neurol.* 514, 240–258.

Carvalho, A.L., Caldeira, M.V., Santos, S.D., and Duarte, C.B. (2008). Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S310–S324.

Chahrour, M., Jung, S.Y., Shaw, C., Zhou, X., Wong, S.T.C., Qin, J., and Zoghbi, H.Y. (2008). MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224–1229.

Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S., and Jaenisch, R. (2006a). The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341–348.

Chang, Q., Khare, G., Dani, V., Nelson, S., and Jaenisch, R. (2006b). The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341–348.

Chang, Y.S., Wang, L., Suh, Y.-A., Mao, L., Karpen, S.J., Khuri, F.R., Hong, W.K., and Lee, H.-Y. (2004). Mechanisms underlying lack of insulin-like growth factor-binding protein-3 expression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23, 6569–6580.

Chao, H.-T., Zoghbi, H.Y., and Rosenmund, C. (2007). MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. *Neuron* 56, 58–65.

Chapleau, C.A., Calfa, G.D., Lane, M.C., Albertson, A.J., Larimore, J.L., Kudo, S., Armstrong, D.L., Percy, A.K., and Pozzo-Miller, L. (2009). Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiol. Dis.* 35, 219–233.

Chen, H.-K., Fernandez-Funez, P., Acevedo, S.F., Lam, Y.C., Kaytor, M.D., Fernandez, M.H., Aitken, A., Skoulakis, E.M.C., Orr, H.T., Botas, J., et al. (2003a). Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* 113, 457–468.

Chen, J., Alberts, I., and Li, X. (2014). Dysregulation of the IGF-I/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in autism spectrum disorders. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 35, 35–41.

Chen, Q., Zhu, Y.-C., Yu, J., Miao, S., Zheng, J., Xu, L., Zhou, Y., Li, D., Zhang, C., Tao, J., et al. (2010). CDKL5, a protein associated with rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 12777–12786.

Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M., and Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* 27, 327–331.

Chen, W.G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A.E., Griffith, E.C., Jaenisch, R., and Greenberg, M.E. (2003b). Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885–889.

Cho, K.O., Hunt, C.A., and Kennedy, M.B. (1992). The rat brain postsynaptic density fraction contains a homolog of the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *Neuron* 9, 929–942.

Cohen, D.R.S., Matarazzo, V., Palmer, A.M., Tu, Y., Jeon, O.-H., Pevsner, J., and Ronnett, G.V. (2003). Expression of MeCP2 in olfactory receptor neurons is developmentally regulated and occurs before synaptogenesis. *Mol. Cell. Neurosci.* 22, 417–429.

Cohen, S., Gabel, H.W., Hemberg, M., Hutchinson, A.N., Sadacca, L.A., Ebert, D.H., Harmin, D.A., Greenberg, R.S., Verdine, V.K., Zhou, Z., et al. (2011). Genome-wide activity-dependent MeCP2 phosphorylation regulates nervous system development and function. *Neuron* 72, 72–85.

Cohen-Cory, S., Kidane, A.H., Shirkey, N.J., and Marshak, S. (2010). Brain-derived neurotrophic factor and the development of structural neuronal connectivity. *Dev. Neurobiol.* 70, 271–288.

Dailey, M.E., and Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 16, 2983–2994.

Danesin, C., Peres, J.N., Johansson, M., Snowden, V., Cording, A., Papalopulu, N., and Houart, C. (2009). Integration of telencephalic Wnt and hedgehog signaling center activities by Foxg1. *Dev. Cell* 16, 576–587.

Dani, V.S., Chang, Q., Maffei, A., Turrigiano, G.G., Jaenisch, R., and Nelson, S.B. (2005). Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12560–12565.

Dastidar, S.G., Landrieu, P.M.Z., and D’Mello, S.R. (2011). FoxG1 promotes the survival of postmitotic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 402–413.

Dastidar, S.G., Bardai, F.H., Ma, C., Price, V., Rawat, V., Verma, P., Narayanan, V., and D’Mello, S.R. (2012). Isoform-specific toxicity of Mecp2 in postmitotic neurons: suppression of neurotoxicity by FoxG1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 2846–2855.

D’Ercole, A.J., Ye, P., Calikoglu, A.S., and Gutierrez-Ospina, G. (1996). The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Mol. Neurobiol.* 13, 227–255.

Ehrlich, I., Klein, M., Rumpel, S., and Malinow, R. (2007). PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4176–4181.

Elia, M., Falco, M., Ferri, R., Spalletta, A., Bottitta, M., Calabrese, G., Carotenuto, M., Musumeci, S.A., Lo Giudice, M., and Fichera, M. (2008). CDKL5 mutations in boys with severe encephalopathy and early-onset intractable epilepsy. *Neurology* *71*, 997–999.

Elias, G.M., and Nicoll, R.A. (2007). Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins. *Trends Cell Biol.* *17*, 343–352.

Ethell, I.M., and Pasquale, E.B. (2005). Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Prog. Neurobiol.* *75*, 161–205.

Evans, J.C., Archer, H.L., Colley, J.P., Ravn, K., Nielsen, J.B., Kerr, A., Williams, E., Christodoulou, J., Gécz, J., Jardine, P.E., et al. (2005). Early onset seizures and Rett-like features associated with mutations in CDKL5. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *13*, 1113–1120.

Fehr, S., Wilson, M., Downs, J., Williams, S., Murgia, A., Sartori, S., Vecchi, M., Ho, G., Polli, R., Psoni, S., et al. (2013). The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* *21*, 266–273.

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., and Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* *28*, 41–51.

Fifková, E., and Delay, R.J. (1982). Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J. Cell Biol.* *95*, 345–350.

Fingar, D.C., and Blenis, J. (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* *23*, 3151–3171.

Fingar, D.C., Salama, S., Tsou, C., Harlow, E., and Blenis, J. (2002). Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* *16*, 1472–1487.

Fukuda, T., Itoh, M., Ichikawa, T., Washiyama, K., and Goto, Y. (2005). Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of Mecp2-deficient mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *64*, 537–544.

Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2001). Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* *15*, 807–826.

- Guerrini, R., and Parrini, E. (2012). Epilepsy in Rett syndrome, and CDKL5- and FOXP1-gene-related encephalopathies. *Epilepsia* 53, 2067–2078.
- Guy, J., Cheval, H., Selfridge, J., and Bird, A. (2011). The role of MeCP2 in the brain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 631–652.
- Hagberg, B., Aicardi, J., Dias, K., and Ramos, O. (1983). A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann. Neurol.* 14, 471–479.
- Hanashima, C., Li, S.C., Shen, L., Lai, E., and Fishell, G. (2004). Foxg1 suppresses early cortical cell fate. *Science* 303, 56–59.
- Hanefeld, F. (1985). The clinical pattern of the Rett syndrome. *Brain Dev.* 7, 320–325.
- Harris, K.M. (1999). Structure, development, and plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 9, 343–348.
- Harris, T.E., and Lawrence, J.C. (2003). TOR signaling. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2003, re15.
- Hayashi, Y., and Majewska, A.K. (2005). Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. *Neuron* 46, 529–532.
- Hobson, R.P. (1993). *Autism and the Development of Mind* (Taylor & Francis).
- Holtmaat, A.J.G.D., Trachtenberg, J.T., Wilbrecht, L., Shepherd, G.M., Zhang, X., Knott, G.W., and Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron* 45, 279–291.
- Homayounfar, R., Jeddi-Tehrani, M., Cheraghpour, M., Ghorbani, A., and Zand, H. (2014). Relationship of p53 accumulation in peripheral tissues of high-fat diet-induced obese rats with decrease in metabolic and oncogenic signaling of insulin. *Gen. Comp. Endocrinol.*
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* 189, 619–629.
- Humbert, S., Bryson, E.A., Cordelières, F.P., Connors, N.C., Datta, S.R., Finkbeiner, S., Greenberg, M.E., and Saudou, F. (2002). The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev. Cell* 2, 831–837.
- Imessaoudene, B., Bonnefont, J.P., Royer, G., Cormier-Daire, V., Lyonnet, S., Lyon, G., Munnich, A., and Amiel, J. (2001). MECP2 mutation in non-fatal, non-progressive encephalopathy in a male. *J. Med. Genet.* 38, 171–174.

Itoh, M., Ide, S., Takashima, S., Kudo, S., Nomura, Y., Segawa, M., Kubota, T., Mori, H., Tanaka, S., Horie, H., et al. (2007). Methyl CpG-binding protein 2 (a mutation of which causes Rett syndrome) directly regulates insulin-like growth factor binding protein 3 in mouse and human brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 66, 117–123.

Jones, P.L., Veenstra, G.J., Wade, P.A., Vermaak, D., Kass, S.U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A.P. (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187–191.

Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10, 381–391.

Kelleher, R.J., and Bear, M.F. (2008). The autistic neuron: troubled translation? *Cell* 135, 401–406.

Kim, D.H., and Sabatini, D.M. (2004). Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 259–270.

Kim, E., and Sheng, M. (2009). The postsynaptic density. *Curr. Biol. CB* 19, R723–R724.

Kim, S., Burette, A., Chung, H.S., Kwon, S.-K., Woo, J., Lee, H.W., Kim, K., Kim, H., Weinberg, R.J., and Kim, E. (2006). NGL family PSD-95-interacting adhesion molecules regulate excitatory synapse formation. *Nat. Neurosci.* 9, 1294–1301.

Kishi, N., and Macklis, J.D. (2004). MECP2 is progressively expressed in post-migratory neurons and is involved in neuronal maturation rather than cell fate decisions. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 306–321.

Kokura, K., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Nomura, T., Khan, M.M., Shinagawa, T., Yasukawa, T., Colmenares, C., and Ishii, S. (2001). The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 276, 34115–34121.

Koleske, A.J. (2013). Molecular mechanisms of dendrite stability. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 536–550.

Korobova, F., and Svitkina, T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell* 21, 165–176.

Landi, S., Putignano, E., Boggio, E.M., Giustetto, M., Pizzorusso, T., and Ratto, G.M. (2011). The short-time structural plasticity of dendritic spines is altered in a model of Rett syndrome. *Sci. Rep.* 1.

Lin, C., Franco, B., and Rosner, M.R. (2005). CDKL5/Stk9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 3775–3786.

Lyst, M.J., Ekiert, R., Ebert, D.H., Merusi, C., Nowak, J., Selfridge, J., Guy, J., Kastan, N.R., Robinson, N.D., de Lima Alves, F., et al. (2013). Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat. Neurosci.* *16*, 898–902.

Malumbres, M., Harlow, E., Hunt, T., Hunter, T., Lahti, J.M., Manning, G., Morgan, D.O., Tsai, L.-H., and Wolgemuth, D.J. (2009). Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1275–1276.

Mari, F., Azimonti, S., Bertani, I., Bolognese, F., Colombo, E., Caselli, R., Scala, E., Longo, I., Grosso, S., Pescucci, C., et al. (2005). CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1935–1946.

Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., and Sun, Y.E. (2003). DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science* *302*, 890–893.

Matijevic, T., Knezevic, J., Slavica, M., and Pavelic, J. (2009). Rett syndrome: from the gene to the disease. *Eur. Neurol.* *61*, 3–10.

Milani, D., Pantaleoni, C., D'Arrigo, S., Selicorni, A., and Riva, D. (2005). Another patient with MECP2 mutation without classic Rett syndrome phenotype. *Pediatr. Neurol.* *32*, 355–357.

Misra, U.K., and Pizzo, S.V. (2010). Ligation of cell surface GRP78 with antibody directed against the COOH-terminal domain of GRP78 suppresses Ras/MAPK and PI 3-kinase/AKT signaling while promoting caspase activation in human prostate cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* *9*, 142–152.

Miyoshi, G., and Fishell, G. (2012). Dynamic FoxG1 expression coordinates the integration of multipolar pyramidal neuron precursors into the cortical plate. *Neuron* *74*, 1045–1058.

Montini, E., Andolfi, G., Caruso, A., Buchner, G., Walpole, S.M., Mariani, M., Consalez, G., Trump, D., Ballabio, A., and Franco, B. (1998). Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* *51*, 427–433.

Mullaney, B.C., Johnston, M.V., and Blue, M.E. (2004). Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain. *Neuroscience* *123*, 939–949.

Nan, X., Meehan, R.R., and Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res.* 21, 4886–4892.

Nan, X., Campoy, F.J., and Bird, A. (1997). MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88, 471–481.

Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386–389.

Neul, J.L., Kaufmann, W.E., Glaze, D.G., Christodoulou, J., Clarke, A.J., Bahi-Buisson, N., Leonard, H., Bailey, M.E.S., Schanen, N.C., Zappella, M., et al. (2010). Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann. Neurol.* 68, 944–950.

Nishijima, T., Piriz, J., Duflot, S., Fernandez, A.M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., Verdugo, J.M.G., Leroy, F., Soya, H., Nuñez, A., et al. (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron* 67, 834–846.

Ogier, M., Wang, H., Hong, E., Wang, Q., Greenberg, M.E., and Katz, D.M. (2007). Brain-derived neurotrophic factor expression and respiratory function improve after ampakine treatment in a mouse model of Rett syndrome. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10912–10917.

O’Kusky, J.R., Ye, P., and D’Ercole, A.J. (2000). Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 8435–8442.

Oray, S., Majewska, A., and Sur, M. (2004). Dendritic spine dynamics are regulated by monocular deprivation and extracellular matrix degradation. *Neuron* 44, 1021–1030.

Owonikoko, T.K., and Khuri, F.R. (2013). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: biomarkers of success and tribulation. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book ASCO Am. Soc. Clin. Oncol. Meet.*

Paoloni-Giacobino, A., and Chaillet, J.R. (2006). The role of DMDs in the maintenance of epigenetic states. *Cytogenet. Genome Res.* 113, 116–121.

Pardridge, W.M. (1993). Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 692, 126–137.

Percy, A.K. (2011). Rett syndrome: exploring the autism link. *Arch. Neurol.* 68, 985–989.

Percy, A.K., Neul, J.L., Glaze, D.G., Motil, K.J., Skinner, S.A., Khwaja, O., Lee, H.-S., Lane, J.B., Barrish, J.O., Annese, F., et al. (2010). Rett syndrome diagnostic criteria: lessons from the Natural History Study. *Ann. Neurol.* *68*, 951–955.

Philippe, C., Villard, L., De Roux, N., Raynaud, M., Bonnefond, J.P., Pasquier, L., Lesca, G., Mancini, J., Jonveaux, P., Moncla, A., et al. (2006). Spectrum and distribution of MECP2 mutations in 424 Rett syndrome patients: a molecular update. *Eur. J. Med. Genet.* *49*, 9–18.

Ricciardi, S., Kilstrup-Nielsen, C., Bienvenu, T., Jacquette, A., Landsberger, N., and Broccoli, V. (2009). CDKL5 influences RNA splicing activity by its association to the nuclear speckle molecular machinery. *Hum. Mol. Genet.* *18*, 4590–4602.

Ricciardi, S., Boggio, E.M., Grosso, S., Lonetti, G., Forlani, G., Stefanelli, G., Calcagno, E., Morello, N., Landsberger, N., Biffo, S., et al. (2011). Reduced AKT/mTOR signaling and protein synthesis dysregulation in a Rett syndrome animal model. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 1182–1196.

Ricciardi, S., Ungaro, F., Hambrock, M., Rademacher, N., Stefanelli, G., Brambilla, D., Sessa, A., Magagnotti, C., Bachi, A., Giarda, E., et al. (2012). CDKL5 ensures excitatory synapse stability by reinforcing NGL-1-PSD95 interaction in the postsynaptic compartment and is impaired in patient iPSC-derived neurons. *Nat. Cell Biol.* *14*, 911–923.

Riikonen, R., Makkonen, I., Vanhala, R., Turpeinen, U., Kuikka, J., and Kokki, H. (2006). Cerebrospinal fluid insulin-like growth factors IGF-1 and IGF-2 in infantile autism. *Dev. Med. Child Neurol.* *48*, 751–755.

Roux, P.P., Shahbazian, D., Vu, H., Holz, M.K., Cohen, M.S., Taunton, J., Sonenberg, N., and Blenis, J. (2007). RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J. Biol. Chem.* *282*, 14056–14064.

Rusconi, L., Salvatoni, L., Giudici, L., Bertani, I., Kilstrup-Nielsen, C., Broccoli, V., and Landsberger, N. (2008). CDKL5 expression is modulated during neuronal development and its subcellular distribution is tightly regulated by the C-terminal tail. *J. Biol. Chem.* *283*, 30101–30111.

Schanen, N.C., Kurczynski, T.W., Brunelle, D., Woodcock, M.M., Dure, L.S., and Percy, A.K. (1998). Neonatal encephalopathy in two boys in families with recurrent Rett syndrome. *J. Child Neurol.* *13*, 229–231.

Shahbazian, M.D., and Zoghbi, H.Y. (2002). Rett syndrome and MeCP2: linking epigenetics and neuronal function. *Am. J. Hum. Genet.* *71*, 1259–1272.

Shen, L., Nam, H.-S., Song, P., Moore, H., and Anderson, S.A. (2006). FoxG1 haploinsufficiency results in impaired neurogenesis in the postnatal hippocampus and contextual memory deficits. *Hippocampus* *16*, 875–890.

Shimada, S., Okamoto, N., Ito, M., Arai, Y., Momosaki, K., Togawa, M., Maegaki, Y., Sugawara, M., Shimojima, K., Osawa, M., et al. (2013). MECP2 duplication syndrome in both genders. *Brain Dev.* 35, 411–419.

Skene, P.J., Illingworth, R.S., Webb, S., Kerr, A.R.W., James, K.D., Turner, D.J., Andrews, R., and Bird, A.P. (2010). Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol. Cell* 37, 457–468.

Takano, K., Watanabe-Takano, H., Suetsugu, S., Kurita, S., Tsujita, K., Kimura, S., Karatsu, T., Takenawa, T., and Endo, T. (2010). Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-1-induced sarcomeric actin filament formation. *Science* 330, 1536–1540.

Tao, J., Van Esch, H., Hagedorn-Greiwe, M., Hoffmann, K., Moser, B., Raynaud, M., Sperner, J., Fryns, J.-P., Schwinger, E., Gécz, J., et al. (2004). Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 1149–1154.

Tarquinio, D.C., Motil, K.J., Hou, W., Lee, H.-S., Glaze, D.G., Skinner, S.A., Neul, J.L., Annese, F., McNair, L., Barrish, J.O., et al. (2012). Growth failure and outcome in Rett syndrome: specific growth references. *Neurology* 79, 1653–1661.

Tashiro, A., and Yuste, R. (2003). Structure and molecular organization of dendritic spines. *Histol. Histopathol.* 18, 617–634.

Thoenen, H., and Sendtner, M. (2002). Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat. Neurosci.* 5 *Suppl*, 1046–1050.

Thomas, G.M., and Huganir, R.L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 173–183.

Tropea, D., Kreiman, G., Lyckman, A., Mukherjee, S., Yu, H., Horng, S., and Sur, M. (2006). Gene expression changes and molecular pathways mediating activity-dependent plasticity in visual cortex. *Nat. Neurosci.* 9, 660–668.

Tropea, D., Giacometti, E., Wilson, N.R., Beard, C., McCurry, C., Fu, D.D., Flannery, R., Jaenisch, R., and Sur, M. (2009). Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2029–2034.

Tsankova, N., Renthal, W., Kumar, A., and Nestler, E.J. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 355–367.

Vacca, M., Filippini, F., Budillon, A., Rossi, V., Mercadante, G., Manzati, E., Gualandi, F., Bigoni, S., TrabANELLI, C., Pini, G., et al. (2001). Mutation analysis

of the MECP2 gene in British and Italian Rett syndrome females. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 78, 648–655.

Vadlakonda, L., Dash, A., Pasupuleti, M., Anil Kumar, K., and Reddanna, P. (2013). The Paradox of Akt-mTOR Interactions. *Front. Oncol.* 3, 165.

Van den Veyver, I.B., and Zoghbi, H.Y. (2000). Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 275–279.

Villard, L., Kpebe, A., Cardoso, C., Chelly, P.J., Tardieu, P.M., and Fontes, M. (2000). Two affected boys in a Rett syndrome family: clinical and molecular findings. *Neurology* 55, 1188–1193.

Wang, H., Chan, S., Ogier, M., Hellard, D., Wang, Q., Smith, C., and Katz, D.M. (2006). Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in *Mecp2* null mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 10911–10915.

Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M., and Webb, D.J. (2008). N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J. Biol. Chem.* 283, 15912–15920.

Woo, J., Kwon, S.-K., and Kim, E. (2009). The NGL family of leucine-rich repeat-containing synaptic adhesion molecules. *Mol. Cell. Neurosci.* 42, 1–10.

Xu, X., and Pozzo-Miller, L. (2013). A novel DNA-binding feature of MeCP2 contributes to Rett syndrome. *Front. Cell. Neurosci.* 7, 64.

Yang, G., Pan, F., and Gan, W.-B. (2009). Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature* 462, 920–924.

Yang, G., Pan, F., Parkhurst, C.N., Grutzendler, J., and Gan, W.-B. (2010). Thinned-skull cranial window technique for long-term imaging of the cortex in live mice. *Nat. Protoc.* 5, 201–208.

Yoshii, A., and Constantine-Paton, M. (2007). BDNF induces transport of PSD-95 to dendrites through PI3K-AKT signaling after NMDA receptor activation. *Nat. Neurosci.* 10, 702–711.

Young, J.I., Hong, E.P., Castle, J.C., Crespo-Barreto, J., Bowman, A.B., Rose, M.F., Kang, D., Richman, R., Johnson, J.M., Berget, S., et al. (2005). Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17551–17558.

Zappella, M., Meloni, I., Longo, I., Hayek, G., and Renieri, A. (2001). Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. *Am. J. Med. Genet.* 104, 14–22.

Zhang, Y., Matt, L., Patriarchi, T., Malik, Z.A., Chowdhury, D., Park, D.K., Renieri, A., Ames, J.B., and Hell, J.W. (2014). Capping of the N-terminus of PSD-95 by calmodulin triggers its postsynaptic release. *EMBO J.* 33, 1341–1353.

Zheng, W.-H., and Quirion, R. (2004). Comparative signaling pathways of insulin-like growth factor-1 and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons and the role of the PI3 kinase pathway in cell survival. *J. Neurochem.* 89, 844–852.

Zhou, Z., Hong, E.J., Cohen, S., Zhao, W.-N., Ho, H.-Y.H., Schmidt, L., Chen, W.G., Lin, Y., Savner, E., Griffith, E.C., et al. (2006). Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation. *Neuron* 52, 255–269.

Zhu, Y.-C., Li, D., Wang, L., Lu, B., Zheng, J., Zhao, S.-L., Zeng, R., and Xiong, Z.-Q. (2013). Palmitoylation-dependent CDKL5-PSD-95 interaction regulates synaptic targeting of CDKL5 and dendritic spine development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9118–9123.

